

**SufD -
Bestandteil eines essentiellen plastidär lokalisierten
Systems in Cyanobakterien, Cryptomonaden
und höheren Pflanzen**

DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Elmar Hjorth
aus Braunschweig

Marburg 2005

Vom Fachbereich Biologie der
Philipps-Universität Marburg
als Dissertation angenommen am:

15.12.2005

Erstgutachter:

Prof. Dr. Uwe-G. Maier

Zweitgutachter:

Prof. Dr. Klaus Lingelbach

Datum der mündlichen Prüfung:

20.12.2005

Meinen Eltern

Aus der vorliegenden Arbeit sind folgende Publikationen entstanden:

Hjorth, E., Hadfi, K., Gould, S., Kawach, O., Sommer, M., Zauner, S., Maier, U.-G. (2004)
Zero, one, two, three, and perhaps four. Endosymbiosis and the gain and loss of plastids.
Endocytobiosis Cell Res. **15**: 459-468

Hjorth, E., Hadfi, K., Zauner, S., Maier, U.-G. (2005) Unique genetic compartmentalization
of the SUF system in cryptophytes and characterization of a SufD mutant in *Arabidopsis*
thaliana. *FEBS Lett.* **579**: 1129-1135

I. Abkürzungsverzeichnis

ABC	ATP binding cassette	U	Units (Einheit für Enzym-aktivität)
AT	Adenin, Thymin		
ATNAP	<i>Arabidopsis thaliana</i> non-intrinsic ABC Protein	UV	Ultraviolett
ATP	Adenosintriphosphat	Vol	Volumen
bp	Basenpaare	WT	Wildtyp
cDNA	komplementäre DNA		
D	Dalton		
DIG	Digoxigenin		
dNTP	2'-Deoxynucleosidtriphosphat		
DTT	Dithiothreitol		
ER	Endoplasmatisches Reticulum		
et al.	und andere		
Fe-S	Eisen-Schwefel		
GFP	Grün fluoreszierendes Protein		
IgG	Immunoglobulin G		
ISC	Iron-Sulfur-Cluster		
KLSM	Konfokales Laser Scanning Mikroskop		
KO	Knock-out		
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure		
NIF	Nitrogen Fixation		
OD	Optische Dichte		
orf, ORF	Offenes Leseraster		
PAGE	Polyacrylamid-gelelektrophorese		
PCR	Polymerase-Kettenreaktion		
rpm	Umdrehungen pro Minute		
RT	Raumtemperatur		
SDS	Natriumdodecylsulfat		
SUF	Mobilization of Sulfur		

II. Abbildungen und Tabellen

Abbildung	1.1.	Primäre Endosymbiose.....	15
Abbildung	1.2.	Sekundäre Endosymbiose	16
Abbildung	1.3.	Elektronenmikroskopische Aufnahme von <i>Guillardia theta</i>	18
Abbildung	1.4.	Bestandteile des SUF- und ISC-Systems zur Biosynthese von Eisen-Schwefel-Cluster (Fe-S) Proteinen	22
Abbildung	1.5.	Das SUF-System in Cryptomonaden	23
Abbildung	2.1.	Schema der Herstellung von GST-Fusionsprotein.....	50
Abbildung	2.2.	Affymetrix <i>Arabidopsis</i> ATH1 Genchip.....	55
Abbildung	2.3.	Prinzip des 2-Hybrid Systems	57
Abbildung	3.1.	Aminosäuren-Alignment von ausgewählten ORF467-Homologen	59
Abbildung	3.2.	N-terminale Extensionen Nucleomorph-kodierter Proteine.....	60
Abbildung	3.3.	Immundetektion von ORF467.....	61
Abbildung	3.4.	In situ Lokalisation von ORF467 in <i>Guillardia theta</i>	62
Abbildung	3.5.	In silico Sekundärstrukturanalyse von ORF467.....	63
Abbildung	3.6.	In silico Sekundärstrukturanalyse von YCF24.....	64
Tabelle	3.7.	In silico β -Barrel Vorhersage für ORF467.....	65
Abbildung	3.8.	Kristallstruktur von SufD aus <i>E.coli</i>	66
Abbildung	3.9.	Konstrukte zur 2-Hybrid Interaktionsanalyse von ORF467.	67
Tabelle	3.10.	Hefe 2-Hybrid Interaktionsanalyse von ORF467.....	68
Abbildung	3.11.	Alignment von SufS-Aminosäuresequenzen.....	69
Abbildung	3.12.	Das <i>suf</i> -Operon von <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803.....	71
Abbildung	3.13.	Schema der gezielten Mutation von <i>slr0076</i> in <i>Synechocystis</i>	71
Abbildung	3.14.	Analyse der Mutation von <i>slr0076</i> (<i>sufD</i>).....	72
Abbildung	3.15.	Phänotyp von <i>Aslr0076</i> Zellen von <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	74
Abbildung	3.16.	Elektronenmikroskopische Aufnahmen von <i>Synechocystis</i> <i>Aslr0076</i> Zellen.....	75
Abbildung	3.17.	UV-VIS Absorptionsspektrum von <i>Aslr0076</i> und Wildtyp Zellen	76
Abbildung	3.18.	UV-VIS Ableitungsspektrum <i>Aslr0076</i> und Wildtyp Zellen	77
Abbildung	3.19.	Eisenimport in <i>Synechocystis</i> <i>Aslr0076</i> und Wildtyp Zellen.....	78
Tabelle	3.20.	Vorhersage der plastidären Transitpeptid-Sequenz.....	79
Abbildung	3.21.	Proteindomänen von <i>Arabidopsis thaliana</i> ATNAP6.....	79

Abbildung	3.22. Plastidäre Lokalisation von ATNAP6-GFP Fusionsprotein in <i>Arabidopsis thaliana</i> Protoplasten	81
Abbildung	3.23. Plastidäre Lokalisation von ATNAP6-GFP Fusionsprotein	82
Abbildung	3.24. Plastidäre Lokalisation von ATNAP6 $\Delta\beta$ -Helix -GFP Fusionsprotein	83
Abbildung	3.25. A und B. Plastidäre Lokalisierung von ATNAP6 Δ C-Term und ATNAP6 Δ C-Term, $\Delta\beta$ -Helix GFP Fusionsproteinen	84
Abbildung	3.25. C und D. Plastidäre Lokalisierung von modifizierten ATNAP6- GFP Fusionsproteinen	85
Abbildung	3.25. E und F. Plastidäre Lokalisierung von modifizierten ATNAP6- GFP Fusions-proteinen	86
Abbildung	3.26. Plastidäre Lokalisation ORF467-GFP Fusionsprotein	87
Abbildung	3.27. Konstrukte zur 2-Hybrid Interaktionsanalyse von ATNAP6.	88
Tabelle	3.28. Hefe 2-Hybrid Interaktionsanalyse von ATNAP6.	88
Abbildung	3.29. PCR-Analyse von <i>Arabidopsis thaliana</i> T-DNA Insertionsmutanten der Linie Salk N55595	90
Abbildung	3.30. T-DNA Insertion in <i>Arabidopsis thaliana</i> Salk Linie N55595	91
Abbildung	3.31. Die Salk Linie N55595 enthält nur eine T-DNA Insertion im Genom	92
Abbildung	3.32. Vergleich von <i>atnap6</i> und Wildtyp Pflanzen	93
Abbildung	3.33. <i>atnap6</i> und Wildtyp Wurzelkultur in Flüssigmedium	94
Abbildung	3.34. Vergleich der durchschnittlichen primären Wurzellänge von <i>atnap6</i> und Wildtyp	95
Abbildung	3.35. Reife Samen von Wildtyp und <i>atnap6</i> Pflanzen	95
Abbildung	3.36. Samen-Phänotyp von Wildtyp und <i>atnap6</i> Pflanzen	96
Abbildung	3.37. Lichtmikroskopische Aufnahmen von <i>atnap6</i> Embryonen	97
Abbildung	3.38. Chlorophyllgehalt von <i>atnap6</i> und Wildtyp	98
Abbildung	3.39. Vergleich von <i>atnap6</i> und Wildtyp Plastiden	99
Abbildung	3.40. Kontrolle der RNA-Präparationen	101
Abbildung	3.41. Korrelation der Microarray-Expressionsdaten	102
Tabelle	3.42. Änderung der Expression in <i>atnap6</i>	103
Tabelle	3.43. Änderung der Expression in <i>atnap6</i>	105
Abbildung	3.44. Änderung der Expression im Stoffwechsel von <i>atnap6</i> : Übersicht	108
Abbildung	3.45. Änderung der Expression von Photosynthesegenen in <i>atnap6</i>	109
Tabelle	3.46. Änderung der Expression von Photosynthese-Genen	110
Abbildung	3.47. Änderung der Expression von Genen des Sekundären Stoffwechsels	110

Tabelle	3.48. Änderungen der Genexpression im Sekundären Stoffwechsel	111
Abbildung	3.49. Änderung der Expression von regulativen Genen in <i>atnap6</i>	112
Tabelle	3.50. Änderung der Expression von regulativen Genen in <i>atnap6</i>	113
Abbildung	3.51. Änderung der Expression von Genen der zellulären Stressantwort und Entwicklung	114
Tabelle	3.52. Änderung der Expression von Genen der zellulären Stressantwort und Entwicklung	115
Tabelle	3.53. Änderung der Genexpression für Enzyme der Tetrapyrrolsynthese	116
Abbildung	3.54. Änderung der Expression der SUF-Komponenten in <i>atnap6</i>	117
Tabelle	4.1. <i>suf</i> -Gene in verschiedenen Organismen.	120
Abbildung	4.2. Kompartimentalisierung der <i>suf</i> -Gene in verschiedenen Organismen.	123
Abbildung	4.3. Effekt von <i>atnap6</i> während der Embryogenese.	126
Abbildung	4.4. Vergleich der subplastidären Lokalisation von ATNAP6 und Ferritin.	136
Abbildung	4.5. Ultrastruktur von <i>atnap6</i> und Eisenmangel ausgesetzten Tabak-Chloroplasten.	138
Abbildung	4.6. Modell der Fe-S Cluster Biosynthese des SUF-Systems	140
Abbildung	4.7. Modell der Funktion von ATNAP6 / SufD	141

III. Inhaltsverzeichnis

I.	Abkürzungsverzeichnis	5
II.	Abbildungen und Tabellen	6
III.	Inhaltsverzeichnis	9
1	Einleitung	14
1.1	Moderne Eukaryoten	14
1.2	Entwicklung phototropher Eukaryoten	14
1.3	Komplexe Plastiden – Zeugen der Sekundären Endosymbiose	16
1.4	Die Cryptomonade <i>Guillardia theta</i>	17
1.5	Der Nucleomorph von <i>Guillardia theta</i>	18
1.6	Nucleomorph-kodierte plastidäre Proteine	19
1.6.1	ORF467	20
1.7	Eisen-Schwefel Cluster Proteine und ihre Biosynthese	20
1.7.1	Das SUF-System	22
1.7.2	Das SUF-System in <i>Guillardia theta</i>	23
1.8	Zielsetzung dieser Arbeit	24
2	Material und Methoden	25
2.1	Material	25
2.1.1	Chemikalien	25
2.1.2	Radiochemikalien	26
2.1.3	Puffer und Lösungen	26
2.1.4	Filter und Membranen	27
2.1.5	Fotomaterialien	27
2.1.6	Molekularbiologische und biochemische Kits	27
2.1.7	Enzyme	28
2.1.8	DNA- und RNA-Längenstandards	28
2.1.9	Protein-Molekulargewichts-Standard	29
2.1.10	Oligonukleotide	29
2.1.11	Antikörper	31
2.1.12	Vektoren	31
2.1.13	Bakterien- und Hefestämme	31
2.1.14	Kulturmedien	32
2.1.14.1	Kulturmedien für <i>Escherichia coli</i>	32

2.1.14.2	Kulturmedium für <i>Guillardia theta</i>	33
2.1.14.3	Kulturmedium für <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	33
2.1.14.4	Kulturmedium für <i>Arabidopsis thaliana</i> Zellkulturen	34
2.2	Geräte	34
2.3	Software	36
2.4	Methoden.....	37
2.4.1	Kultivierung der verwendeten Organismen	37
2.4.1.1	Kultur von <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	37
2.4.1.2	Kultur von <i>Guillardia theta</i>	37
2.4.1.3	Kultur von <i>Arabidopsis thaliana</i> Pflanzen und Mesophyll-Zellen	37
2.4.1.4	Kultur von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	38
2.4.2	Molekularbiologische Methoden.....	38
2.4.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	38
2.4.2.2	Isolierung von genomischer DNA aus <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	39
2.4.2.3	Isolierung von genomischer DNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	39
2.4.2.4	Isolierung von genomischer DNA aus <i>Guillardia theta</i>	40
2.4.2.5	RNA Isolierung aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	41
2.4.2.6	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	41
2.4.2.7	Auftrennung von DNA durch Agarose-Gelelektrophorese.....	41
2.4.2.8	Elution von DNA aus Agarose-Gelen.....	41
2.4.2.9	Dephosphorylierung von linearen DNA-Fragmenten	42
2.4.2.10	Transformation von <i>Escherichia coli</i> XL1-blue MRF'	42
2.4.2.11	Transformation von <i>Escherichia coli</i> BL21 CodonPlus	42
2.4.2.12	Transformation von <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803.....	43
2.4.3	Biochemische Methoden	44
2.4.3.1	Proteinbestimmung.....	44
2.4.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	44
2.4.3.3	Anfärbung von SDS-Gelen	45
2.4.3.4	Elektroelution von Proteinen.....	46
2.4.3.5	Elektrochemischer Transfer von Proteinen (Westernblot).....	46
2.4.3.6	Immunanfärbung mit Peroxidase	47
2.4.3.7	In situ Detektion von Proteinen in <i>Guillardia theta</i>	48
2.4.3.8	Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	49
2.4.3.9	Herstellung von Proteinextrakt aus <i>Guillardia theta</i>	50

2.4.3.10	Eisenimport in <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 Zellen.....	51
2.4.3.11	Bestimmung des Chlorophyllgehalts von <i>Arabidopsis thaliana</i>	51
2.4.4	In vivo Lokalisation von <i>Arabidopsis thaliana</i> ATNAP6	52
2.4.4.1	Transiente Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> Mesophyllzellkulturen.....	53
2.4.4.2	Herstellung von Protoplasten	53
2.4.4.3	Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> Protoplasten	54
2.4.4.4	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie zur Detektion von GFP- Fusionsproteinen	55
2.4.5	Genchip Microarray-Expressionsanalyse (Affymetrix).....	55
2.4.6	Hefe 2-Hybrid Interaktionsanalyse	56
3	Ergebnisse	58
3.1	<i>Guillardia theta</i> ORF467	58
3.1.1	ORF467 ist homolog zu Proteinen aus Cyanobakterien, Bakterien und Pflanzen.....	58
3.1.2	ORF467 ist ein exprimiertes <i>Guillardia theta</i> Protein.....	60
3.1.3	ORF467 ist in der Plastide von <i>Guillardia theta</i> lokalisiert.....	62
3.1.4	ORF467 besitzt eine ungewöhnliche Sekundärstruktur	63
3.1.5	ORF467 ist kein β -Barrel Membranprotein	65
3.1.6	ORF467 besitzt eine β -Helix Struktur.....	66
3.1.7	2-Hybrid Interaktionsanalyse von ORF467 aus <i>Guillardia theta</i>	67
3.1.8	<i>Guillardia theta</i> besitzt ein im Kern lokalisiertes Gen für SufS	69
3.2	SufD in <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	70
3.2.1	<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 enthält ein <i>suf</i> -Operon.....	70
3.2.2	Mutation von <i>slr0076</i> in <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803.....	71
3.2.3	Eine vollständige <i>slr0076</i> Knock-out Mutation in <i>Synechocystis</i> ist lethal	72
3.2.4	Δ <i>slr0076</i> Zellen von <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 zeigen einen spezifischen Phänotyp	73
3.2.5	Elektronenmikroskopische Untersuchung von Δ <i>slr0076</i> Zellen	74
3.2.6	UV-VIS Absorptionsspektren von Δ <i>slr0076</i> Zellen.....	76
3.2.7	<i>Synechocystis</i> Δ <i>slr0076</i> Zellen zeigen eine erhöhte Eisenaufnahme.....	78
3.3	SufD in <i>Arabidopsis thaliana</i>	79
3.3.1	In vivo Lokalisation eines ATNAP6-GFP Fusionsproteins	80
3.3.2	Ein <i>Arabidopsis</i> ATNAP6-GFP Fusionsprotein ist plastidenlokalisiert.....	80

3.3.3	Die β -Helix Domäne von ATNAP6 aus <i>Arabidopsis thaliana</i> verursacht eine subplastidäre Lokalisation	83
3.3.4	ORF467 (SufD) aus <i>Guillardia theta</i> wird in <i>Arabidopsis</i> Chloroplasten importiert	87
3.3.5	2-Hybrid Interaktionsanalyse von ATNAP6	87
3.4	Charakterisierung einer <i>atlg32500</i> T-DNA Insertionsmutante von <i>A. thaliana</i>	89
3.4.1	Die Salk <i>Arabidopsis</i> T-DNA Insertionslinie N55595 enthält eine Insertion in <i>atlg32500</i>	89
3.4.2	Lokalisierung der T-DNA Insertionsstelle	91
3.4.3	Phänotypische Analyse der <i>Arabidopsis sufD</i> Mutante <i>atnap6</i>	93
3.4.3.1	Die Mutante <i>atnap6</i> zeigt ein reduziertes Wurzelwachstum	94
3.4.3.2	<i>atnap6</i> bildet zahlreiche defekte und nicht keimfähige Samen aus	95
3.4.3.3	Embryonaldefekte von <i>atnap6</i>	96
3.4.3.4	<i>atnap6</i> Pflanzen weisen einen reduzierten Chlorophyllgehalt auf	98
3.4.3.5	Plastiden von <i>atnap6</i> zeigen eine veränderte Thylakoidstruktur	98
3.4.3.6	Zusammenfassung der phänotypischen Analyse von <i>atnap6</i> Pflanzen ...	99
3.5	Genchip Expressionsanalyse von WT und <i>atnap6</i> Pflanzen	100
3.5.1	Vergleich der Expressionsmuster von <i>atnap6</i> und WT	102
3.5.1.1	<i>atnap6</i> Gene mit veränderter Expression	103
3.5.2	Vergleich der Genexpression von <i>atnap6</i> in funktionellen Kategorien	107
3.5.2.1	Vergleich der <i>atnap6</i> Genexpression im allgemeinen Stoffwechsel	108
3.5.2.2	Vergleich der <i>atnap6</i> Genexpression im Photosynthese-System	109
3.5.2.3	Vergleich der <i>atnap6</i> Genexpression im Sekundären Metabolismus	110
3.5.2.4	Vergleich der <i>atnap6</i> Genexpression von regulativen Genen	112
3.5.2.5	Vergleich der <i>atnap6</i> Expression von Genen der zellulären Stressantwort und Entwicklung	114
3.5.2.6	Expression der <i>atnap6</i> Tetrapyrrolsynthese-Enzyme	116
3.5.2.7	Expression der <i>suf</i> -Gene <i>sufA</i> bis <i>sufE</i> in <i>atnap6</i>	117
3.5.3	Zusammenfassung der Microarray-Analyse von <i>atnap6</i>	117
4	Diskussion	119
4.1	ORF467 in <i>Guillardia theta</i>	119
4.1.1	Cryptomonaden besitzen ein plastidär lokalisiertes SUF-System	119
4.1.2	SufS – kernkodierte Komponente des SUF-Systems in Cryptomonaden	121

4.1.3	Die genomische Kompartimentalisierung des SUF-Systems in Cryptomonaden	122
4.2	SufD in <i>Arabidopsis thaliana</i>	125
4.2.1	Der <i>atnap6</i> Embryonaldefekt	125
4.2.2	Die <i>atnap6</i> Funktion ist nicht auf die Embryonalentwicklung beschränkt... ..	127
4.2.3	<i>atnap6</i> Phänotypen als Folge lichtabhängiger Regulationen ?	128
4.2.4	Reduzierte Transkription von Zellwand modifizierenden Enzymen in <i>atnap6</i>	129
4.2.5	Die A-Type ARR Transkriptionsfaktoren in <i>atnap6</i>	130
4.2.6	<i>atnap6</i> Phänotypen als Folge einer Cytokinin-Signalisierung ?	131
4.2.7	Reduzierter Chlorophyllgehalt in <i>atnap6</i>	132
4.2.8	Lichtstress in <i>atnap6</i> Plastiden ?	133
4.2.9	Die subplastidäre Lokalisation von ATNAP6: Kolokalisation mit Ferritin ? ..	135
4.2.10	<i>atnap6</i> Plastiden zeigen einen Eisenmangel-Phänotyp	137
4.2.11	Der cyanobakterielle <i>sufD</i> Knock-Out: Weitere Hinweise auf Eisenmangel ..	138
4.3	Ein Modell für die Funktion von ATNAP6 in <i>Arabidopsis thaliana</i>	140
5	Zusammenfassung	143
6	Literatur	144

1 Einleitung

1.1 Moderne Eukaryoten

Die Entwicklung der heute vorkommenden Eukaryoten lässt sich etwa 1,2 Mrd. Jahre zurückverfolgen (Butterfield, 2000). Im Gegensatz zu den älteren, etwa 1,6 Mrd. Jahre alten Eukaryoten enthalten die Zellen moderner Eukaryoten wie Pflanzen, Tiere und Pilze, verschiedene membranumschlossene Kompartimente, die Organellen. Zwei Arten von Organellen, die Plastiden und die Mitochondrien, entwickelten sich aus vormals freilebenden Bakterien, wie durch genetische Untersuchungen gezeigt werden konnte. Das Genom der Mitochondrien enthält Sequenzen, die auf eine Abstammung von den Proteobakterien schließen lässt, die Plastiden hingegen stammen von oxigene Photosynthese betreibenden Cyanobakterien ab.

Mit der allgemein anerkannten Endosymbiontentheorie (Margulis, 1970) wird die Entwicklung der modernen eukaryotischen Zelle durch die Aufnahme von cyanobakteriellen und proteobakteriellen Zellen und ihre anschließende Reduzierung zu den heute zu beobachtenden Organellen beschrieben.

1.2 Entwicklung phototropher Eukaryoten

Die Plastiden von Pflanzen, Grünalgen und Rotalgen sind durch zwei umgebende Hüllmembranen vom Cytosol der Zelle getrennt. Die Entstehung dieser Organellen geht auf die Aufnahme eines prokaryotischen Cyanobakteriums durch eine eukaryote Wirtszelle zurück (Palmer und Delwiche, 1996; Cavalier-Smith, 2003). Diese primäre Endosymbiose ermöglichte es der ursprünglich heterotrophen eukaryoten Wirtszelle, die Photosynthesefähigkeit des aufgenommenen Symbionten für eine phototrophe Lebensweise zu nutzen. Im Laufe der Evolution erfolgte die Reduzierung des Symbionten zum semi-autonomen Organell. Die cyanobakterielle Zellwand aus Peptidoglycan, der Mureinsacculus, verschwand, lediglich in den Plastiden der Glaucocystophyceen sind noch Reste dieser ursprünglichen Zellwand zwischen den beiden Hüllmembranen der Plastide vorhanden. Um jedoch die Vorteile der Photosynthesefähigkeit des Symbionten für die Wirtszelle zugänglich zu machen, waren Modifikationen von bestehenden Stoffwechselwegen notwendig. Es

erfolgte ein massiver lateraler Gentransfer vom Symbionten zum Zellkern des Wirts und ein Verlust von redundanten Genen des Symbionten. In *Arabidopsis thaliana* konnte gezeigt werden, dass bis zu 4500 Gene des Zellkerns ursprünglich aus dem Genom des Symbionten stammen (Martin et al., 2002). Die nach diesem Transfer nun auf dem Zellkern kodierten Enzyme für plastidäre Funktionen mussten durch geeignete Transportsysteme wieder an ihren Wirkungsort transportiert werden. Um die Photosynthese des Symbionten zur Synthese von Saccharose und Stärke im Cytosol nutzen zu können, wurden die Membranen des cyanobakteriellen Symbionten mit Transportsystemen zum Export von Glycerinaldehyd-3-phosphat ausgestattet. Das Genom des Symbionten wurde bis auf wenige hundert Gene, von ursprünglich mehreren Tausend, reduziert (Martin et al., 1998). Es entstanden die zum semi-autonomen Organell reduzierten primären Plastiden, die in den Rhodophyten, den Chlorophyten und den Glaucocystophyten anzutreffen sind (Abbildung 1.1).

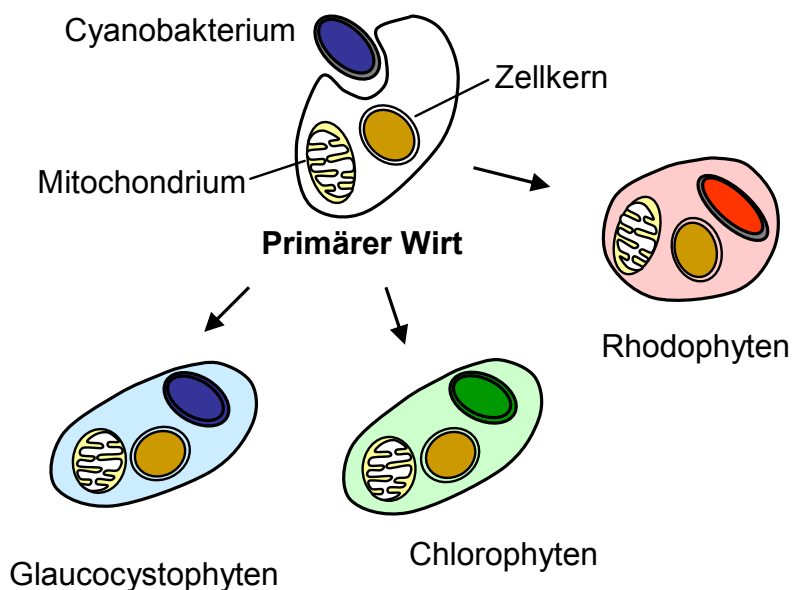


Abbildung 1.1. Primäre Endosymbiose.

Durch phylogenetische Studien wird heute allgemein angenommen, dass nur eine einzige primäre Endosymbiose erfolgreich verlaufen war (Martin et al., 2002, Stoebe und Kowallik, 1999). Alle Plastiden sind demnach monophyletischen Ursprungs und die beobachteten Unterschiede, zum Beispiel in der Zusammensetzung der Photosynthesepigmente im späteren Verlauf der Evolution entstanden.

1.3 Komplexe Plastiden – Zeugen der Sekundären Endosymbiose

Die Plastiden zahlreicher Algen weisen eine von mehr als zwei Hüllmembranen umschlossene Plastide auf. Zu diesen Algenarten gehören unter anderem die Diatomeen, die global mit am bedeutendsten Photosynthese betreibenden Organismen. Nach der Theorie der primären Endosymbiose lässt sich die Entstehung von Plastiden mit drei oder vier Membranen nicht erklären. Vielmehr entstanden diese sogenannten „komplexen“ Plastiden durch die Aufnahme und nachfolgende Reduzierung einer phototrophen eukaryoten Zelle durch eine phagotrophe eukaryote Wirtszelle. Dieser Vorgang wird als Sekundäre Endosymbiose bezeichnet (Cavalier-Smith, 2003; McFadden, 2001; Delwiche und Palmer, 1997). Die vollständige Eliminierung des eukaryoten Symbionten führte bei den Euglenophyten und den Peridinin enthaltenden Dinoflagellaten zu einer von drei Membranen begrenzten Plastide (siehe Abbildung 1.2).

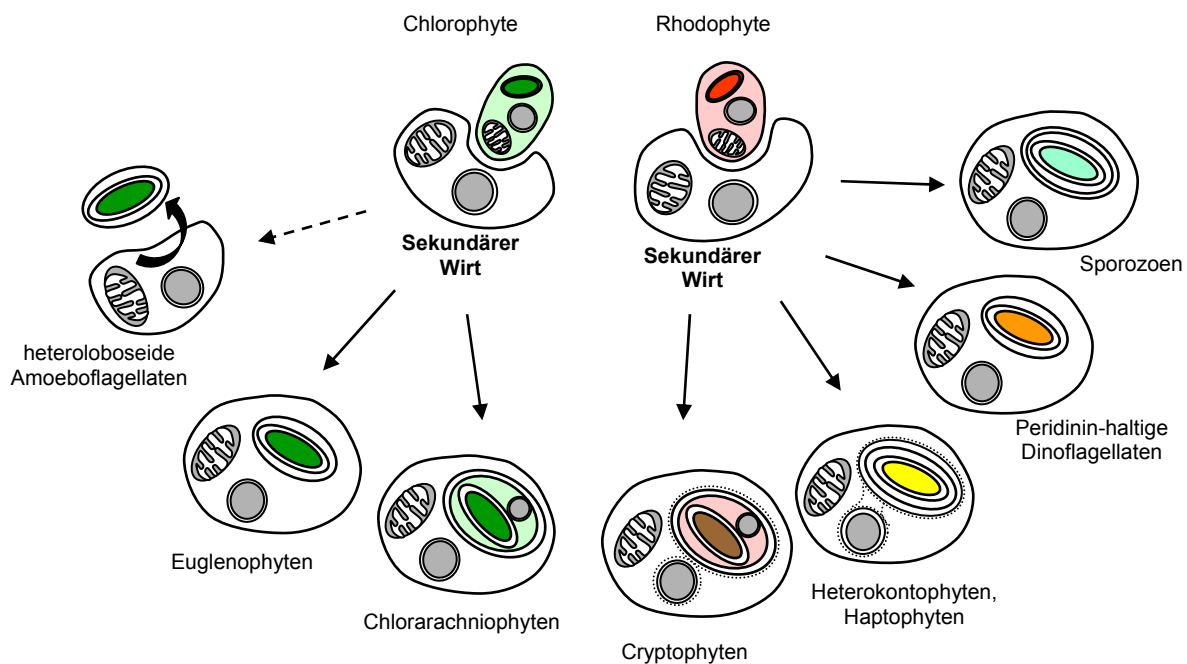


Abbildung 1.2. Sekundäre Endosymbiose.

Die Plastiden der Heterokontophyten, der Haptophyten und der Sporozoen sind hingegen von vier Membranen umgeben. Eine die Theorie der Sekundären Endosymbiose untermauernde evolutionäre Zwischenstufe ist bei den Cryptophyten und den Chlorarachniophyten zu

beobachten (Maier et al., 2000; Maier et al., 1991). Sowohl die Chlorarachniophyten als auch die Cryptophyten besitzen einen Rest des Cytosols des ursprünglichen Symbionten, das periplastidäre Kompartiment, zwischen den zwei äußeren und den zwei inneren Hüllmembranen der Plastide. In diesem Cytosol befindet sich das reduzierte Relikt des eukaryoten Zellkerns des Symbionten, der Nucleomorph.

Bei dem Nucleomorph der Chlorarachniophyten (Hibberd und Norris, 1984) handelt es sich um den reduzierten ehemaligen Zellkern einer Grünalge, während der Nucleomorph der Cryptophyten (Greenwood, 1974) der Rest eines Rotalgenkerns ist (Gilson und McFadden, 2002). Anders als bei der primären Endosymbiose sind die in sekundärer Symbiose entstandenen Arten folglich polyphyletischen Ursprungs. Für den Erfolg der sekundären Endosymbiose war, ähnlich wie bereits bei der primären Endosymbiose, die Verlagerung der essentiellen Gene des Symbionten in den Zellkern des Wirts und die nachfolgende Entwicklung von Transportsystemen zum Reimport der entsprechenden Proteine in den Symbionten, von entscheidender Bedeutung. Die neuerliche Verlagerung von Genen für plastidäre Proteine vom Kern des Symbionten in das Kerngenom des Wirts, ein Gentransfer von Eukaryot zu Eukaryot, erforderte die Neuentwicklung von Transportsystemen. Erst der Transport von plastidären Proteinen in die komplexe Plastide und der Export von Produkten der Photosynthese in das Cytosol ermöglichten es dem Wirt, die Photosynthese-Fähigkeit des Endosymbionten zu nutzen und diesen im folgenden bis zur komplexen Plastide zu reduzieren.

1.4 Die Cryptomonade *Guillardia theta*

Die Cryptomonade *Guillardia theta* ist ein einzelliger, mariner Photosynthese-betreibender Eukaryot. Die Zelle schützt sich durch einen Periplasten, der aus Proteinplatten besteht, und besitzt zwei Flagellen (Abbildung 1.3). Die Cryptomonade enthält eine komplexe Plastide, die von vier Membranen umgeben ist. Die äußere der vier Membranen geht in die Hüllmembran des Zellkerns über und ist mit cytosolischen 80S-Ribosomen besetzt, sie wird deshalb auch als cER, chloroplastidäres Endoplasmatisches Retikulum, bezeichnet. Als Photopigmente der Plastide sind Chlorophyll a, c2 und Phycoerithrin vorhanden, Speicherstärke wird in Form von Amylopektin im Periplastidären Kompartiment angehäuft.

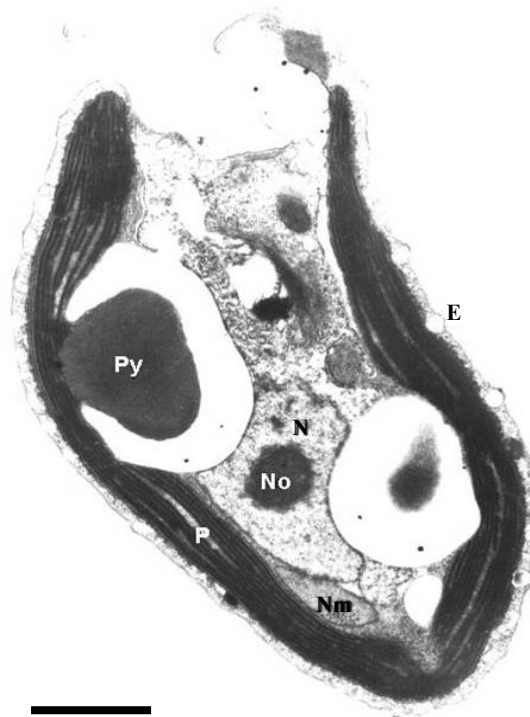


Abbildung 1.3. Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Guillardia theta*.

Abbildung einer Cryptomonadenzelle im Querschnitt (aus Fraunholz, 1997). P: Plastide, N: Nukleus, No: Nukleolus, Py: Pyrenoid, E: Ejektosom, Nm: Nucleomorph. Maßstab: 1 μm .

1.5 Der Nucleomorph von *Guillardia theta*

Die eigentliche Besonderheit der Cryptomonaden liegt jedoch im Vorhandensein des Nucleomorphs im periplastidärem Kompartiment, dem Raum zwischen den zwei inneren und den zwei äußeren, die Plastide umgebenden Membranen.

Beim Nucleomorph handelt es sich um den Rest des ursprünglichen Zellkerns der im Zuge der sekundären Endosymbiose aufgenommenen ancestralen Rotalge. Das Genom des Nucleomorphs besitzt eine Größe von 551 Kilobasen (Douglas et al., 2001) und ist damit eines der kleinsten bekannten eukaryotischen Genome. Die drei Chromosomen des Nucleomorphs enthalten nur etwa 9 % nichtkodierende DNA, Introns sind nur in begrenztem Umfang anzutreffen (Zauner et al., 2000). Nach Berechnungen von Beaton und Cavalier-Smith (1999) wurde der Nucleomorph von *Guillardia theta* gegenüber dem Genom der ancestralen Rotalge um das 125-fache reduziert. Der überwiegende Teil der Gene wurde

eliminiert oder in den Zellkern des Wirts transferiert. Im Genom des Nucleomorphs verblieben im wesentlichen Gene zur Transkription und Translation und zur Prozessierung von RNA und Proteinen des periplastidären Kompartiments und des Nucleomorphs, sogenannte Housekeeping-Gene. Im Gegensatz dazu fehlen Proteine für den Stoffwechsel und cytosolische Strukturen (Douglas et al., 2001).

1.6 Nucleomorph-kodierte plastidäre Proteine

Eine wichtige Entdeckung war die Identifizierung von auf dem Nucleomorph kodierten plastidären Proteinen (Zauner et al., 2000, Douglas et al., 2001). Hierzu gehören Rubredoxin und das an der Plastidenteilung beteiligte FtsZ (Wastl et al., 2000, Fraunholz et al., 1998). Auf dem Nucleomorph sind 30 Proteine kodiert, die Homologien zu cyanobakteriellen Proteinen aufweisen und diesen gegenüber eine N-terminale Extension als putatives topogenes Signal für den Import in die Plastide besitzen (Douglas et al., 2001). Nach der Theorie der primären Endosymbiose wurden die Gene dieser Proteine aus dem cyanobakteriellen Genom in das Genom der Rotalge verlagert und erhielten durch zufällige genetische Rekombination ein topogenes Signal für den Reimport der Proteine in die Plastide. In diese Gruppe fallen auf dem Nucleomorph kodierte Proteine wie das Chaperon cpn60, die Topoisomerase-Untereinheiten GyrA und GyrB und das an der Proteintranslokation beteiligte Tic22, sowie zahlreiche Proteine, deren Funktion und auch die Funktion der cyanobakteriellen Homologen, weitgehend oder teilweise unbekannt ist. Die Analyse der Funktion von plastidären Proteine mit bislang unbekannter Funktion, die auf dem Nucleomorph kodiert sind und in die Plastide reimportiert werden, ist folglich von besonderem Interesse zur Aufklärung grundlegender Plastidenfunktionen.

Nach einer Theorie ist die Reduzierung des Nucleomorphs in den Cryptomonaden und Chlorarachniophyten ein laufender Prozeß, der zukünftig zum völligen Verlust des Nucleomorphs führen wird (Gilson, 2001). Untersuchungen an Genomen von Mitochondrien und Chloroplasten zeigten, dass bestimmte Proteine vorwiegend in den Organellen und nicht im Kern kodiert sind, eventuell um die Expression am Ort der Funktion effizienter zu gestalten (Pfannschmidt et al., 2001; Race et al., 1999). Somit besteht die Möglichkeit, dass einige Nucleomorph-lokalisierte Gene nicht in das Genom der Wirtszelle übertragen werden können und der Nucleomorph zu einem obligaten Bestandteil der Cryptomonaden und Chlorarachniophyten geworden ist.

Durch die vollständige Sequenzierung des Nucleomorph-Genoms wurde es ermöglicht, gezielt nach vormals cyanobakteriellen Genen zu suchen, die auf dem Nucleomorph lokalisiert sind und deren Proteine in die Plastide importiert werden. Sind diese Gene mit plastidärer Funktion zusätzlich auf keinem anderem Genom der Cryptomonade, dem Zellkern oder dem Plastidengenom, lokalisiert, so liegt die Vermutung nahe, dass das Vorhandensein dieser Gene eine wichtige Ursache für die Beibehaltung des Nucleomorphs in Cryptomonaden ist.

1.6.1 ORF467

ORF467 (Open-Reading-Frame 467) ist ein auf Chromosom I des Nucleomorphs von *Guillardia theta* kodiertes Protein von 467 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 53,9 kDa. Die Aminosäuresequenz von ORF467 zeigt Homologien zu Proteinen aus Bakterien und Pflanzen, zum Beispiel zu Slr0076 aus *Synechocystis* sp. PCC6803 und zu At1g32500 (ATNAP6) aus *Arabidopsis thaliana*. Im Vergleich zu den bakteriellen Homologen weist die Aminosäuresequenz von ORF467 eine N-terminale Extension auf. Da bekannt ist, dass Nucleomorph-kodierte und plastidär lokalisierte Proteine von *Guillardia theta* eine N-terminale Extension als topogenes Signal für den Import in die Plastide besitzen (Wastl und Maier, 2000), kann ORF467 ein plastidär lokalisiertes Protein sein.

Funktionelle Analysen von bakteriellen Homologen von ORF467 zeigten eine Beteiligung an der Synthese von Eisen-Schwefel (Fe-S) Clustern in *Escherichia coli* (Outten et al., 2004) und *Erwinia chrysanthemi* (Nachin et al., 2001). Diese Untersuchungen waren ein Hinweis auf eine eventuelle Funktion von ORF467 für die Synthese von Eisen-Schwefel Clustern in *Guillardia theta*.

1.7 Eisen-Schwefel Cluster Proteine und ihre Biosynthese

Eisen-Schwefel Cluster, vorwiegend in der Form von [2Fe-2S] und [4Fe-4S], kommen als wichtige Cofaktoren für zahlreiche Proteine in allen lebenden Organismen vor. Hauptsächlich übernehmen sie Funktionen des Elektronentransfers oder dienen als katalytische Zentren. Vermutlich waren sie maßgeblich an der Entwicklung des Lebens beteiligt (Martin und Russel, 2003). Eisen-Schwefel (Fe-S) Cluster enthaltende Proteine sind an regulatorischen

und enzymatischen Funktionen, von der Respiration bis zur Genexpression, beteiligt (Johnson, 1998).

Während für die *in vitro* Insertion von Eisen-Schwefel Clustern in Proteine Cystein-Desulfurasen oder NifS-ähnlichen Enzyme ausreichen (Zheng und Dean, 1994, Beinert und Kiley, 1999), ist die *in vivo* Biosynthese und Insertion von Fe-S Clustern Aufgabe von drei bislang bekannten unterschiedlichen Systemen, dem SUF- (Takahashi und Tokumoto, 2002; Loiseau et al., 2003), ISC- (Zheng et al., 1998, Takahashi und Nakamura, 1999; Lill und Mühlenhoff, 2005) und NIF-System (Zheng et al., 1993).

Das NIF- (Nitrogen-Fixation) System ist speziell an der Biosynthese von Nitrogenase-Proteinen in Stickstoff-fixierenden Organismen beteiligt und aktiviert die katalytischen Untereinheiten der Nitrogenase durch den Einbau von Fe-S Clustern (Dos Santos et al., 2004; Frazzon und Dean, 2002). Die beiden hauptsächlichen Systeme zur Synthese von Fe-S Cluster enthaltenden Proteinen sind hingegen das ISC- und das SUF-System.

Das ISC- (Iron-Sulfur-Cluster) System ist ein allgemeines System zur Bildung von Fe-S Proteinen in zahlreichen prokaryoten (Kurihara et al., 2003, Nakamura et al., 1999, Djaman et al., 2004) und eukaryoten Organismen (Lill und Kispal, 2000).

Die SUF- und ISC-Systeme bestehen aus mehreren Komponenten (Abbildung 1.4).

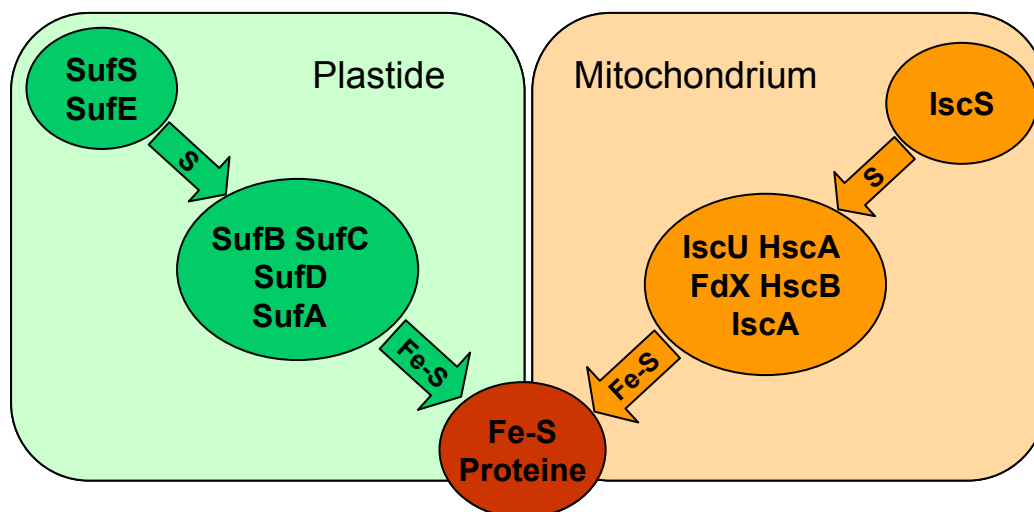


Abbildung 1.4. Bestandteile des SUF- und ISC-Systems zur Biosynthese von Eisen-Schwefel-Cluster (Fe-S) Proteinen.

Schematische Darstellung der SUF- und ISC-Systeme zur Synthese von Fe-S Clustern für plastidäre (SUF) und mitochondrielle (ISC) Proteine. S: Schwefel, Fe-S: Eisen-Schwefel-Cluster

Beide Systeme enthalten eine Cystein-Desulfurase, SufS bzw. IscS (Patzner und Hantke, 1999, Mihara et al., 1999, Outten et al., 2003), „Scaffold“ (Gerüst)-Proteine wie SufA und IscU (Ollagnier-de-Choudens et al., 2004, Agar et al., 2000) und mehrere für das jeweilige System spezifische Proteine.

1.7.1 Das SUF-System

Das SUF-System kommt in Prokaryoten und Pflanzen, nicht jedoch in anderen höheren Eukaryoten vor (Ellis et al., 2001) und ist an der Synthese von Fe-S Clustern und deren Einbau in plastidäre Fe-S Cluster Proteine beteiligt.

Für drei Proteine des SUF-Systems, SufB, SufC und SufD, sind keine Homologen im ISC-System vorhanden. In den Genomen von Cyanobakterien sind die Gene *sufB*, *sufC*, *sufD* und *sufS* in Form eines Operons angeordnet (Wang et al., 2004), im Falle von *E. coli* und *Erwinia chrysanthemi* umfasst das *suf*-Operon zusätzlich *sufA* und *sufE* (Takahashi und Tokumoto, 2002; Nachin et al., 2001). Für das Protein SufC wurde eine ATPase-Aktivität nachgewiesen (Rangachari et al., 2002) und eine Interaktion mit SufB und SufD gezeigt (Nachin et al., 2003; Xu und Möller, 2004). Unabhängige Mutationen von *sufB*, *sufC* und *sufD* führten zu Hinweisen auf eine Beteiligung des SUF-Systems an der Synthese von Fe-S Clustern unter Bedingungen von oxidativem Stress und Eisenmangel (Djaman et al., 2004; Nachin et al., 2001; Nachin et al., 2003). In *Arabidopsis thaliana* waren bei der Mutation von *sufC* Embryonaldefekte zu beobachten, während eine *sufB*-Mutation eine Akkumulation von Protoporphyrin IX zeigte (Xu und Möller, 2004; Möller et al., 2001).

Die Lokalisierung von einem oder mehreren Genen des SUF-System im Genom der Plastide ist offenbar nicht essentielle Voraussetzung für die Funktion. In höheren Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana* finden sich die Komponenten des SUF-Systems ausschließlich auf dem Zellkern kodiert, weisen jedoch ein Transitpeptid als topogenes Signal für den Import in die Plastide auf, wie am Beispiel von SufB gezeigt werden konnte (Möller et al., 2001, Martin et al., 1998). Ein Gen für SufB ist im Genom des Apicoplasten, der nicht mehr photosynthetisch aktiven Plastide des Malariaerregers *Plasmodium falciparum*, enthalten (Law et al., 2000; Wilson et al., 1996). Weitere Komponenten des SUF-Systems, SufA, SufC, SufD und SufS sind im Kern von *Plasmodium falciparum* kodiert, und im Fall von SufC wurde eine N-terminale Signalsequenz und putatives Plastiden-Transitpeptid identifiziert (Waller et al., 2000). Dies deutet darauf hin, dass das SUF-System ein plastidär lokalisiertes System ist.

1.7.2 Das SUF-System in *Guillardia theta*

Die Gene des *suf*-Operons wurden mit der Etablierung des prokaryoten Endosymbionten in die ancestrale Rotalge eingebracht. Die Analyse von heutigen Rotalgengenomen zeigte, dass *sufB* und *sufC* im Plastidengenom lokalisiert sind (Kowallik et al., 1995), während *sufD* und *sufS* auf den Zellkern transferiert wurden. Bei den durch sekundäre Endosymbiose entstandenen Cryptophyten sind *sufB* und *sufC* im Plastidengenom verblieben (Douglas und Penny, 1999). Im Genom des Nucleomorphs von *Guillardia theta* ist ein SufD-Homolog (ORF467) kodiert (Hjorth et al., 2005), das eine N-terminale Extension als topogenes Signal für den Import in die Plastide aufweist. Für *Guillardia theta* kann somit das Vorliegen eines in der Plastide lokalisierten SUF-Systems angenommen werden. Weitere *suf*-Gene können im Kerngenom enthalten sein, dieses ist derzeit im Gegensatz zu den anderen Genomen von *Guillardia theta* nicht vollständig sequenziert. Zu erwarten ist, dass Gene für SufE, SufA und SufS im Kern lokalisiert sind (Abbildung 1.5).

Mit der Identifizierung von *suf*-Genen im Kern wäre die Cryptomonade *Guillardia theta* der erste bekannte Organismus mit einem über drei verschiedene Genome verteiltem funktionellem System, das vermutlich zur Synthese von Eisen-Schwefel Clustern in der Plastide dient.

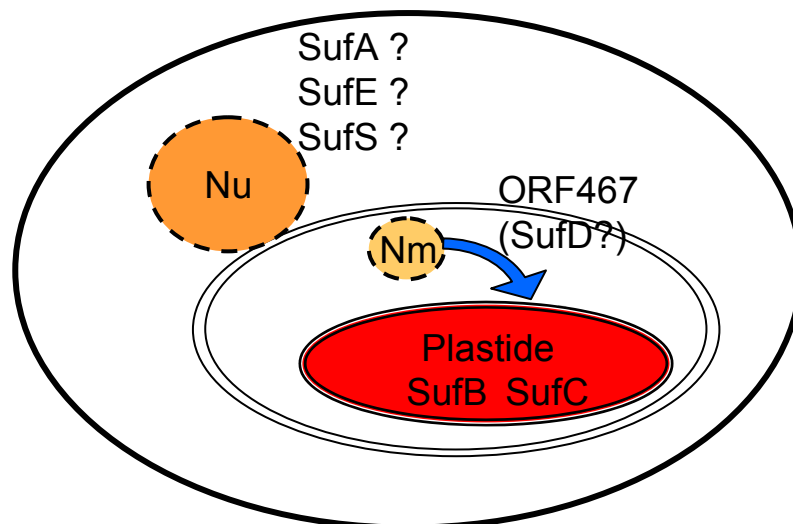


Abbildung 1.5. Das SUF-System in Cryptomonaden.

Schematische Darstellung der Verteilung der bekannten Komponenten des SUF-Systems in *Guillardia theta*. Nu: Zellkern, Nm: Nucleomorph, Pl: Plastide.

1.8 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, das auf Chromosom I des Nucleomorphs von *Guillardia theta* kodierte und putativ plastidär lokalisierte Protein ORF467 funktionell zu charakterisieren. Hinweisen auf die Funktion von ORF467 sollen durch die phänotypische Analyse von Knock-out Mutanten der Homologen Proteine Slr0076 im Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC6803 und At1g32500 (ATNAP6) in *Arabidopsis thaliana* gewonnen werden. Neben der Dokumentation von Phänotypen soll eine gezielte Charakterisierung der Mutanten mit biochemischen und molekularbiologischen Methoden erfolgen. Durch Protein-Interaktionsanalysen mit dem Hefe 2-Hybrid System sollen Interaktionspartner von ORF467 in *Guillardia theta* und ATNAP6 in *Arabidopsis thaliana* identifiziert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit ist vorgesehen, die *in vivo* Lokalisation von ORF467 durch immunologische Methoden zu bestimmen und die Lokalisation des Homologen ATNAP6 in *Arabidopsis thaliana* durch die *in vivo* Expression von GFP-Fusionsproteinen aufzuklären.

Als wichtiger Bestandteil zur Analyse des *Arabidopsis thaliana* Homologen von ORF467 ist die Durchführung einer Expressionsanalyse der Knock-out Mutante mit einem Genchip-Microarray System geplant, um phänotypischen Daten im zellulären Zusammenhang interpretieren zu können und Rückschlüsse auf eine Funktion von ATNAP6 bei der Synthese von Fe-S Clustern herstellen zu können.

Mit der Auswertung von EST-Daten von *Guillardia theta* soll nach im Kerngenom kodierten SUF-Komponenten gesucht werden, um die Verteilung des SUF-Systems in Cryptomonaden im evolutionären Zusammenhang diskutieren zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden grundsätzlich in der Qualität p.a von den Firmen Sigma-Aldrich (München), Roth (Karlsruhe) und Merck (Darmstadt) bezogen.

2-Mercaptoethanol	Serva	Kanamycin	Sigma
Adenin-hemisulfat	Roth	Magermilchpulver	Fluka
Agar-Agar	Roth	Methanol	Roth
Agarose (NEEO Ultra)	Roth	NP-40	Sigma
Ammoniumpersulfat	Sigma	Pepton (tryptisch verdaut)	Roth
Ampicillin	Sigma	Phenol (TE-gepuffert)	Roth
Bromphenolblau	Biorad	Phenol, TE-gepuffert	Roth
CSPD und CDP-Star	Boehringer	Polyethylenglycol 6000	Sigma
CTAB	Sigma	Roti®-Blue	Roth
DMF	Aldrich	Rotiphorese® 30	Roth
DMSO	Sigma	Saccharose	Roth
Chloroform	Merck	SDS	Roth
DTT	Roth	SLS	Sigma
EDTA	Sigma	Sorbitol	Roth
Formaldehyd 37%-ig	Roth	TEMED	Roth
Glucose	Roth	Tetracyclin	Sigma
Glutathion	Sigma	Tinte, königsblau	Pelikan
Glycerin	Roth	Triton X-100	Roth
Glycin	Roth	Tween-20	Sigma
Hefeextrakt	Roth	X-Gal	Roth
IPTG	Roth	X-Gal	Roth
Isoamylalkohol	Merck	Yeast nitrogen base	Sigma
Isopropanol	Roth		
Kanamycin	Serva		

2.1.2 Radiochemikalien

Redivue L-[³⁵ S] Methionin 18,5 MBq, 500µCi	Amersham Biosciences, Freiburg
⁵⁵ FeCl ₃ 10 MBq	ICN

2.1.3 Puffer und Lösungen

Die Herstellung nicht aufgelisteter Puffer wurde grundsätzlich nach Sambrook (Sambrook et al., 1989) durchgeführt, davon abweichende Zusammensetzungen sind in der Beschreibung der jeweiligen Methoden aufgeführt.

TE-Puffer, pH 8.0	10 mM	Tris / HCl pH 8,0
	1 mM	EDTA
TBE-Puffer, pH 8.8	134 mM	Tris / HCl pH 8.8
	44 mM	Borsäure
	2,5 mM	EDTA
DNA-Ladepuffer	4 M	Harnstoff
	50 mM	EDTA
	50 % (w/v)	Saccharose
	0,1 % (w/v)	Bromphenolblau
	0,1 % (w/v)	Xylencyanol
PBS-Puffer, pH 7.3	140 mM	NaCl
	10 mM	Na ₂ HPO ₄
	2,7 mM	KCl
	1,8 mM	KH ₂ PO ₄
20 x SSC-Puffer pH 7.0	3 M	NaCl
	0,3 M	Natriumcitrat

2.1.4 Filter und Membranen

Nitrocellulosemembran Protran	Schleicher & Schuell, Dassel
Nylonmembran HyBondN ⁺	Amersham Pharmacia, Freiburg
Sterilfilter 0,2 µm FP-30	Schleicher & Schuell, Dassel
Whatman-Papier 3MM	Schleicher & Schuell, Dassel

2.1.5 Fotomaterialien

Röntgenfilm RX Medical	Fujifilm, Düsseldorf
Röntgenfilm-Entwickler	Kodak, Stuttgart
Röntgenfilm-Fixierer	Kodak, Stuttgart
Agfaortho Negativfilm	Agfa-Gevaert, Leverkusen
Scientia EM Film	Agfa-Gevaert, Leverkusen
Fotopapier Agfa BN310RC	Agfa-Gevaert, Leverkusen
Entwickler Agfa Rodinal	Agfa-Gevaert, Leverkusen
Fixierer Agfa Leukobrom	Agfa-Gevaert, Leverkusen

2.1.6 Molekularbiologische und biochemische Kits

RedExtract-N-Amp Plant PCR Kit	Sigma-Aldrich, München
RNeasy Plant Kit	Qiagen, Hilden
peqLab peqGOLD RNAPure	Peqlab, Erlangen
JETsorb DNA Extraction Kit	Genomed, Löhne
Qiagen Plasmid Midi / Maxi Kit	Qiagen, Hilden
pGEM-T Vector System	Promega, Mannheim
PCR DIG Probe Synthesis Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
GST Gene Fusion System	Amersham Biosciences, Freiburg
Construction & Screening Kit	
Pierce SuperSignal West Pico	Perbio, Bonn
Chemoluminescent Substrate Kit	
Thermo sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing Kit with 7-deaza-dGTP	Amersham Biosciences, Freiburg

TransformAID Bacterial Transformation Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
Clontech MATCHMAKER Library Construction Kit	BD Biosciences, Heidelberg
Clontech Yeastmaker YEAST Transformation System 2	BD Biosciences, Heidelberg

2.1.7 Enzyme

Nicht aufgeführte DNA-modifizierende Enzyme, Restriktionsendonukleasen und Proteasen wurden von den Firmen Amersham Biosciences (Freiburg), Roche Diagnostics (Mannheim), Fermentas (St. Leon-Rot), Serva (Heidelberg), Boehringer (Mannheim), Gibco/BRL (Eggenstein), Promega (Mannheim), Sigma-Aldrich (München), Eppendorf (Hamburg) oder Stratagene (Heidelberg) bezogen.

Alkalische Phosphatase aus Shrimp	1000 U/ml	Roche Diagnostics, Mannheim
Taq DNA Polymerase	5000 U/ml	Eppendorf, Hamburg
Pfu DNA Polymerase	3000 U/ml	
T4 DNA Ligase	1000 U/ml	
M-MLV Reverse Transkriptase	200 U/μl	
DNase I	10 U/ml	Boehringer, Ingelheim
Lysozym	20 mg/ml	Sigma-Aldrich, München
RNase A	5 mg/ml	Sigma-Aldrich, München
Cellulase Onozuka RS		Serva, Heidelberg
Macerozym R-10		Serva, Heidelberg

2.1.8 DNA- und RNA-Längenstandards

Ein DNA-Längenstandard wurde durch die Restriktion von 50 μg λ-Phagen DNA (Fermentas) mit den Endonukleasen *EcoRI* und *HindIII* selbst hergestellt. Die Endkonzentration betrug 100 ng/μl.

Als RNA-Längenstandard wurde RNA-HiRange und RNA-LowRange Marker der Firma Fermentas verwendet.

2.1.9 Protein-Molekulargewichts-Standard

Als Molekulargewichts-Standard für die SDS-PAGE von Proteinen wurden Standards *10-200 kDa* und *10-180 kDa prestained* der Firma Fermentas verwendet.

2.1.10 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotid-Primer wurden von der Firma MWG (Ebersberg) bezogen. Die für die Sequenzierung mit dem Licor4200 System verwendeten Primer wurden mit dem fluoreszierendem Farbstoff IRD800 (800 nm-Kanal) oder IRD700 markiert (700 nm-Kanal).

Alle angegebenen Primersequenzen sind in 5'-3' Richtung notiert.

Sequenzierprimer für Licor 4200:

M13 uni (IRD800):	GTA AAA CGA CGG CCA GT
M13 rev (IRD700):	GGA AAC AGC TAT GAC CAT G
T7/2 (fw) IRD 800:	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC
Match seq 3' IRD700:	CAG TAT CTA CGA TTC ATC TGC

Synechocystis sp. PCC6803 Knock-out Konstrukte:

slr0076a for:	GCA GTC GAC TTG TTG GGT AG
slr0076a rev:	GGC TGT TGC TGC AGG CGA TC
slr0076b for:	GAT CGC CTG CAG CAA CAG CC
slr0076b rev:	GCT CCG CGG GAA CAT TTA AC

Guillardia theta GST-Fusionsproteine:

ex467 rev:	CGT CGA CTT ATA AGA TAA AAC ATT TG
ex467 for:	GAA TTC AGT TGA AGA CAT GCA TCT ATC

Arabidopsis thaliana T-DNA Sonde:

NPTII for:	GCT GCT ATT GGG CGA AGT G
NPTII rev:	GAA GGC GAT AGA AGG CGA TGC

Arabidopsis thaliana At1g325000 Sonde:

At1g32500rev S: CCG GTA ACC GTT TCG ATT CC

At1g32500for S: CTC TGA CCC TTT TGT ACT TC

Arabidopsis thaliana T-DNA Screening:

LP Primer: CGT TTG TGA ACT GGG TTT CCG

RP Primer: TCA CGT CTA AAC TTT TTG GGC CAT

LBb1 Primer: TTT TTC GCC CTT TGA CGT TGG AG

LB neu: AAC CAG CGT GGA CCG CTT GCT

GFP-Fusionsproteine:

467GFP for: CGT CTC CCA TGG TCA TTA ATT GTT AC

467GFP rev: CGT CTC CCA TGG CTA ATA ACG AAA AAA TTT TC

GFPneu for: CGT CTC CCA TGG CGG CTG CCA CAG TTC TCG

minusBETA At1g32500 rev: CGT CTC CCA TGG TCA AAT CCG GTG CTC CCA T

Atcpn60TP contr rev: CGT CTC CCA TGG CCT TTA CAT TAG CTC

AtBeta for: CTG CAG ATG GTG ATT TAT GTT CCT G

At1gTPminus for: CTG CAG GCT TCG TTC TCT GAC

AtC for: CTG CAG GAT CTT GAA GAA GAC C

AtN rev: CTG CAG CAA ATC CGG TGC TCC

GFPBeta control for: CGT CTC CCA TGG TGA TTT ATG TTC CTG

minusCA1g32500 rev: CGT CTC CCA TGG CAA GAT CAC TGA TAG CAG C

fullC At1g32500 rev: CGT CTC CCA TGG CGA GCA AGC CTT TGA CGT G

ATcpn60TP rev: CTG CAG CTT TAC ATT AGC TCT AAC AC

ATcpn60 TP for: CGT CTC CCA TGG CGT CTG CAA ACG CTC

467TPminus for: CTG CAG AAC TCA GTT GAA GAC

Hefe 2-Hybrid Konstrukte:

467Beta for: GAA TTC ACA ATA GAA ACA AAC

467Beta rev: GGA TCC CAG AAA CAG TAG CAC

467 3H for: GAA TTC GAT GAT GAA CAA ATG

467 3H rev: GGA TCC AAT TTT CTT TTC AAT AC

At1g 2H rev: GGA TCC GAT TTC CCG ATT TG

2.1.11 Antikörper

anti-ORF467 aus Kaninchen	Eurogentec, Seraign (Belgien)
anti-GST IgG	Amersham Biosciences, Freiburg
anti-Kaninchen IgG aus Ziege, HRP-gekoppelt	Roche Diagnostics, Mannheim
anti-Kaninchen IgG aus Ziege, Gold-gekoppelt	British BioCell International, Cardiff (GB)

2.1.12 Vektoren

pGEM-T	Amp ^r , <i>lacZ'</i> , flori, P _{T7} , P _{SP6}	Promega
pBlueScript II KS +/-	Amp ^r , <i>lacZ'</i> , flori, pUCori, P _{T7} , P _{T3}	Stratagene
pGEX-5x-3	Amp ^r , <i>lacI</i> ^q , pBR322ori, P _{tac} , P _{T7} , GST, Faktor Xa cleavage site	Amersham
pAVA393	(von Arnim et al., 1998)	
pGADT7-Rec	Amp ^r , Gal4 AD, LEU2, pUCori, 2μori, P _{ADH1} , P _{T7} , T _{ADH1} , HA epitope tag	Clontech
pGBKT-7	Kan ^r , Gal4 DNA-BD, Trp1, pUCori, flori, 2μori, P _{ADH1} , P _{T7} , T _{ADH1} , cMyc epitope tag	Clontech

2.1.13 Bakterien- und Hefestämme

Bakterien wurden nach Angaben der Hersteller kultiviert. Die Kultivierung der Hefen erfolgte nach Vorschriften aus dem *Yeast Protocols Handbook* der Firma Clontech.

<i>Escherichia coli</i> BL21-CodonPlus [®] (DER)-RIL	Stratagene
<i>Escherichia coli</i> B F ⁻ , <i>ampT</i> , <i>hsdS</i> (<i>r_B⁻</i> , <i>m_B⁻</i>), <i>dcm</i> ⁺ , <i>Tet</i> ^r , <i>galλ</i> (DE3), <i>endA</i> , <i>Hte</i> [<i>argU</i> , <i>ileY</i> , <i>leuW</i> , <i>cam</i> ^r]	

<i>Escherichia coli</i> XL1-blue MRF'	Stratagene
$\Delta(mcrA)183$, $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$, <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> <i>lac[F'proABlacI^rZ, ΔM15, Tn10 (Tet^r)]</i>	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> AH109	Clontech
<i>MATa</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3, 112</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>gal4Δ</i> , <i>gal80Δ</i> , <i>LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3</i> , <i>GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2</i> , <i>URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ</i> , <i>MEL1</i>	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y187	Clontech
<i>MATa</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>ade2-101</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3, 112</i> , <i>gal4Δ</i> , <i>met^r</i> , <i>gal80Δ</i> , <i>URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ</i> , <i>MEL1</i>	

2.1.14 Kulturmedien

2.1.14.1 Kulturmedien für *Escherichia coli*

LB Medium:	10 g/l	Pepton (tryptisch verdaut)
	10 g/l	Natriumchlorid
	5 g/l	Hefeextrakt
2x YT Medium:	16 g/l	Pepton (tryptisch verdaut)
	10 g/l	Hefeextrakt
	5 g/l	Natriumchlorid
TB Medium:	20 g/l	Pepton (tryptisch verdaut)
	20 g/l	Glukose
	10 g/l	Hefeextrakt

Agarplatten enthielten zusätzlich 15 g/l Agar-Agar, Selektionsmedien wurden mit den jeweiligen Antibiotika versetzt und enthielten typischerweise 50 oder 100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Tetracyclin.

2.1.14.2 Kulturmedium für *Guillardia theta* (nach Guillard, 1975)

f/2-Medium:	5 mM	Tris/HCl pH 7.2
	3 % (w/v)	„Tropic-Marine“ Meersalzmischung
	883 µM	NaNO ₃
	36 µM	NaH ₂ PO ₄
	0,1 % (v/v)	f/2-Spurenelementelösung
	0,1 % (v/v)	f/2-Vitaminlösung
f/2-Spurenelemente- lösung:	11,65 mM	FeCl ₃ x 6 H ₂ O
	11,71 mM	EDTA
	39 µM	CuSO ₄ x 5 H ₂ O
	77 µM	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O
	42 µM	CoCl ₂ x 6 H ₂ O
	910 µM	MnCl ₂ x 4 H ₂ O
	26 µM	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O
f/2-Vitaminlösung:	2 µM	Biotin
	0,37 µM	Cyanocobalamin
	297 µM	Thiamin / HCl

2.1.14.3 Kulturmedium für *Synechocystis* sp. PCC6803 (nach Rippka et al., 1979)

BG-11 Flüssigmedium:	50 mM	TES pH 8.0
	1,75 mM	K ₂ HPO ₄
	1,89 mM	Na ₂ CO ₃
	60 µg/l	FAC
	17,6 mM	NaNO ₃
	0,304 mM	MgSO ₄
	0,245 mM	CaCl ₂
	0,031 mM	Zitronensäure
	2,79 mM	EDTA
	100 ml/l	Trace Metal Mix 1000x

Top-Agar:	0,8 %	Agar-Agar
	99,2 %	Wasser

Für BG-11 Agarplatten wurden 15 g/l Agar-Agar und 3 g/l Natriumthiosulfat zu dem BG-11 Medium gegeben. Die BG-11 Agarplatten konnten zur Selektion mit Antibiotika-haltigem Top-Agar überschichtet werden. Die Konzentrationen des Antibiotikums betrugen im Fall von Kanamycin typischerweise 10 – 80 µg/ml für BG-11 Flüssigmedium und 10 µg/ml für Top-Agar.

2.1.14.4 Kulturmedium für *Arabidopsis thaliana* Zellkulturen

MS Medium pH 5.7:	4,3 g/l	MS Basal Salt Mischung (Sigma M5524)
	30 g/l	Saccharose
	2,5 ml/l	Vitaminlösung
Vitaminlösung:	250 mg/l	Nikotinsäure
	250 mg/l	Pyridoxin / HCl
	2,5 g/l	Thiamin / HCl
	25 g/l	Myo-Inositol

Die Vitaminlösung wurde sterilfiltriert und zu dem autoklavierten MS Medium gegeben.

2.2 Geräte

PCR-Thermocycler

MasterCyclerGradient	Eppendorf, Hamburg
Biomed Thermocycler	Bachhofer, Reutlingen

Sequenzier-Automat

LiCOR 4200	MWG, Ebersberg
------------	----------------

Stromquellen

Electrophoresis Power Supply ESP 301	Amersham Biosciences, Freiburg
GBS 200/ 400	LKB, Bromma

MacroDrive 2301

LKB, Bromma

Schüttler

G24 Environmental Incubator Shaker

New Brunswick Scientific & Co Inc.

Multi Axle rotating shaker

MAGV, Rabenau-Londorf

Ceromat R

Braun Biotech International

Zentrifugen

Tischzentrifuge Centrifuge 5417R

Eppendorf, Hamburg

Kühlzentrifuge Labofuge 400R

Heraeus Instruments, Hanau

Kühlzentrifuge Sorvall RC-5B

Sorvall, Bad Homburg

Refrigerated Superspeed Centrifuge

Kontron

Ultrazentrifuge Centrikon T-1080

Kontron

Elektrophorese und Blotting

Mighty Small™ Dual Gel Caster SE245

Amersham Biosciences, Freiburg

2050 Midget Electrophoresis Unit

Amersham Biosciences, Freiburg

Elutrap® Electroelution System

Schleicher & Schuell, Dassel

Novablot 2117-250 Semidry

Amersham Biosciences, Freiburg

Blotting Apparatur

GelDoc 1000

Biorad, München

Gel-Dokumentationssystem

sonstige Gerätschaften

Ultraschallstab Model 250/ 450

Branson, Dietzenbach

Spektralphotometer Ultrospec 2000

Amersham Biosciences, Freiburg

Transmissionselektronenmikroskop

Philips, Hamburg

EM301

Konfokales Laser Scanning Mikroskop

Leica, Wetzlar

TCS SP2

2.3 Software

Die Erstellung von Sequenzvergleichen („Alignments“) auf Aminosäureebene erfolgte mit den Programmen ClustalX (Jeanmougin et al., 1998) und Genedoc (Nicholas et al., 1997). Nukleotidsequenzen wurden mit dem Programm Sequencher der Firma GeneCodes bearbeitet. Die Auswertung der GFP-Experimente erfolgte mit der Leica Confocal Software (LCS) der Firma Leica, Heidelberg.

3D-PSSM	http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~3dpssm/
BlastN, BlastP, BlastX	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST
ChloroP	http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP
dChip	http://biosun1.harvard.edu/complab/dchip/
HMMTOP	http://www.enzim.hu/hmmtop/
JPRED	http://www.compbio.dundee.ac.uk/~www-jpred/
MapMan	http://gabi.rzpd.de/projects/MapMan/
Pfam	http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/
PlasmoAP	http://www.plasmodb.org/cgi-bin/plasmoap.cgi
PsiPred	http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/psiform.html
PSort	http://psort.nibb.ac.jp/
R	http://www.r-project.org
Sequencher	http://www.genecodes.com/
SOSUI	http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosuimenu0.html
TargetP	http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP
TOPPRED	http://www.sbc.su.se/~erikw/toppred2/

2.4 Methoden

2.4.1 Kultivierung der verwendeten Organismen

2.4.1.1 Kultur von *Synechocystis* sp. PCC6803

Flüssigkulturen von *Synechocystis* wurden in 50 oder 100 ml BG-11 Medium auf einem Schüttler bei 170 rpm und einer Temperatur von 30 °C inkubiert. Die Lichtintensität betrug $40 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Weißlicht. Für heterotrophes Wachstum wurden 5 bis 10 mM Glukose zugegeben. Zur Kulturhaltung von *Synechocystis* auf BG-11 Agarplatten wurden 100 μl einer Flüssigkultur auf die BG-11 Agarplatten ausgebracht und bei 30 °C und leicht reduzierten Lichtintensitäten von $35 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ inkubiert.

2.4.1.2 Kultur von *Guillardia theta*

Eine Flüssigkultur von *Guillardia theta* wurde in einem Liter f/2 Medium bei einer Temperatur von 20 °C kultiviert. Die Lichtbedingungen entsprachen einem 12-stündigen Tag / Nacht-Wechsel mit einer Fluoreszenzlicht (warm-white) Beleuchtung.

Die Flüssigkulturen wurden wöchentlich durch Animpfen von 900 ml f/2 Medium mit 100 ml Stammkultur überimpft.

2.4.1.3 Kultur von *Arabidopsis thaliana* Pflanzen und Mesophyll-Zellen

Arabidopsis thaliana Ecotype Columbia Mesophyll-Zellkulturen wurden in 35 ml MS Medium bei einer Temperatur von 25 °C auf dem Schüttler bei 130 rpm inkubiert. Die Lichtbedingungen entsprachen einem Kurztag mit 8 h Licht und 16 h Dunkelheit. Alle 7 Tage wurden 6 – 10 ml der Kultur in neues Medium überimpft.

Pflanzen von *Arabidopsis thaliana* Ecotype Columbia wurden auf Erde bei einer Temperatur von 22 °C in einem Tag-Nacht Zyklus von 16 h Tag und 8 h Nacht kultiviert.

Zur Analyse der Wurzellänge wurden Samen auf feuchtem Whatman-Papier gekeimt, in sterilen Petrischalen für 6 Tage inkubiert und anschließend vermessen.

2.4.1.4 Kultur von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Kultivierung aller für die Interaktionsanalytik verwendeten Hefen erfolgte exakt nach den Protokollen des Herstellers BD Biosciences / Clontech und ist in dem *Clontech Yeast Protocols Handbook* umfassend beschrieben.

2.4.2 Molekularbiologische Methoden

Allgemeine molekularbiologische Methoden wurden, soweit nicht anders beschrieben, nach Protokollen aus Sambrook et al., 1989 durchgeführt.

2.4.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* Zellen erfolgte nach dem Prinzip der Alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979). Zum Erhalt von hochreiner DNA bzw. größerer Mengen wurden nach Bedarf Kits der Firma Qiagen, Hilden eingesetzt.

Von einer 16 Stunden (über Nacht) gewachsenen *E. coli* Kultur wurden 1,5 ml bei 14.000 rpm und 4 °C für 1 min zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in 200 µl Puffer P1 resuspendiert, mit 200 µl Puffer P2 versetzt und durch Invertieren gemischt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 200 µl Puffer P3 zugegeben. Die Probe wurde vorsichtig gemischt und für 5 min im Eisbad inkubiert. Der entstandene voluminöse Niederschlag wurde durch 20 min Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit 420 µl Isopropanol zur Fällung der Plasmid-DNA versetzt. Es wurde 15 min bei 4 °C und 14.000 rpm zentrifugiert und das erhaltene DNA-Pellet anschließend einmal mit 70%-igem Ethanol gewaschen. Die Plasmid-DNA wurde im Vakuum von Ethanolresten befreit und in 40 µl Wasser aufgenommen.

Puffer P1:	50 mM	Tris / HCl pH 8.0
	10 mM	EDTA
	100 µg/ml	RNase A
Puffer P2:	200 mM	NaOH
	1 % (w/v)	SDS
Puffer P3:	3 M	Kaliumacetat pH 5.5

2.4.2.2 Isolierung von genomischer DNA aus *Synechocystis* sp. PCC6803

Für die Isolierung genomischer DNA aus *Synechocystis* sp. PCC6803 wurden 3 ml einer in der stationären Phase befindlichen Kultur durch 1 Minute Zentrifugation bei 10.000 rpm pelletiert. Das Pellet wurde in 400 µl TE-Puffer pH 8.0 resuspendiert und mit 200 µl Glasperlen, 8 µl 10%-iger SDS-Lösung, 16 µl 5%-iger SLS-Lösung und 400 µl Phenol für dreimal 10 Sekunden gevortext. Zur Phasentrennung wurde bei Raumtemperatur 10 Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und zweimal mit je einem Volumen PCI Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol im Volumenverhältnis 25 / 24 / 1 extrahiert. Anschließend wurde die enthaltene DNA durch die Zugabe von 2 Vol. Ethanol und 0,1 Vol. einer 3 M Natriumacetat-Lösung durch Inkubation bei -20 °C ausgefällt. Die DNA wurde durch Zentrifugation bei 14.000 rpm, 4 °C für 20 Minuten pelletiert, einmal mit 70%-igem Ethanol gewaschen, im Vakuum getrocknet und abschließend in 20 µl Wasser aufgenommen.

2.4.2.3 Isolierung von genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana*

Ein Rosettenblatt von *A.thaliana* wurde in einem Mörser in flüssigem Stickstoff homogenisiert. Das erhaltene Pulver wurde mit 500 µl Extraktionspuffer versetzt und gemischt. 35 µl einer 20%-igen SDS-Lösung wurden zugegeben und die Mischung im Wasserbad bei 65 °C für 5 min inkubiert. Daraufhin wurden 130 µl einer 5 M Kaliumacetat-Lösung zugefügt, 5 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend 10 Minuten bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die darin enthaltene DNA nach der Zugabe von 750 µl Isopropanol und 75 µl einer 3 M Natriumacetat-Lösung bei -20 °C ausgefällt. Die Probe wurde zentrifugiert, das

Pellet einmal mit 70%-igem Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet. Die Aufnahme der DNA erfolgte in 50 µl Wasser oder TE-Puffer.

Extraktionspuffer:	100 mM	Tris / HCl pH 8.0
	0,5 M	Natriumchlorid
	50 mM	EDTA
	10 mM	2-Mercaptoethanol

Die für die Charakterisierung der T-DNA Linie SALK N55595 erforderliche Isolierung von genomischer DNA aus zahlreichen verschiedenen *A.thaliana* Pflanzen wurde mit dem *RedExtract-N-Amp* Kit der Firma Sigma nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

2.4.2.4 Isolierung von genomischer DNA aus *Guillardia theta*

Genomische DNA aus *Guillardia theta* wurde nach der CTAB-Methode (Doyle und Doyle, 1990) gewonnen.

Die durch Zentrifugation pelletierten Zellen einer 14 Tage alten Kultur von *G.theta* wurden einmal mit Wasser gewaschen und in 800 µl CTAB-Puffer resuspendiert. Es wurde 30 Minuten bei 70 °C inkubiert und anschließend 10 Minuten bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und zur Ausfällung von Proteinen mit 1 Volumen PCI (Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol im Volumenverhältnis 25 / 24 / 1) versetzt. Nach 10 Minuten Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4 °C wurde die obere wässrige Phase abgenommen und die darin enthaltene genomische DNA durch Zugabe von Isopropanol ausgefällt, mit 70%-igem Ethanol einmal gewaschen und in einem geeigneten Volumen Wasser aufgenommen.

Puffer CTAB:	100 mM	Tris / HCl pH 8.0
	1,4 M	Natriumchlorid
	20 mM	EDTA
	0,2 % (v/v)	2-Mercaptoethanol

2.4.2.5 RNA Isolierung aus *Arabidopsis thaliana*

Gesamt-RNA aus *Arabidopsis thaliana* wurde mit dem Plant RNeasy Kit der Firma Qiagen gewonnen. Alternativ wurde eine Isolierung mit dem peqGOLD RNApure Reagenz der Firma Peqlab durchgeführt. Es wurden die jeweiligen Protokolle der Hersteller verwendet.

Für die Affymetrix Microarray-Analyse wurde hochreine RNA durch die Kombination beider Systeme isoliert. Zunächst wurde RNA durch das Peqlab-System isoliert, gefolgt von der Aufreinigung der gewonnenen RNA über die Plant RNeasy Säulen des Qiagen Kits. Die Qualität der RNA wurde durch eine Analyse mit dem Biolyzer-System der Firma Agilent nach Protokoll des Herstellers überprüft.

2.4.2.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wurde photometrisch in wässriger Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm durchgeführt. 1 ml der vermessenen Lösung enthielt bei einer Extinktion von 1 50 µg Doppelstrang DNA, 33 µg Einzelstrang DNA oder 40 µg RNA. Als Maß für die Reinheit der Nukleinsäuren wurde Quotient der Absorptionen bei 260 und 280 nm verwendet.

2.4.2.7 Auftrennung von DNA durch Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese zur Analyse von DNA wurde nach Sambrook et al. durchgeführt. Zur Herstellung der Agarose-Gele und als Elektrophorese-Puffer wurde standardmäßig TBE-Puffer verwendet. Der Gelmatrix wurden 3,75 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt.

2.4.2.8 Elution von DNA aus Agarose-Gelen

Zur Elution von DNA aus Agarose-Gelen wurde das JETsorb DNA-Extraction-Kit der Firma Genomed nach Protokoll des Herstellers eingesetzt.

2.4.2.9 Dephosphorylierung von linearen DNA-Fragmenten

Zur Dephosphorylierung von linearisiertem Vektor wurde Alkalische Phosphatase aus Shrimp, bezogen von der Firma Roche Diagnostics verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Protokoll des Herstellers. Das Enzym wurde durch Inkubation bei 65 °C für 20 min deaktiviert.

2.4.2.10 Transformation von *Escherichia coli* XL1-blue MRF'

Das Transformieren von *Escherichia coli* XL1-blue MRF' Zellen mit Plasmid-DNA wurde mit dem TransformAid Kit der Firma Fermentas nach Protokoll des Herstellers durchgeführt.

2.4.2.11 Transformation von *Escherichia coli* BL21 CodonPlus

Der Expressionsvektor pGEX-5X-3 zur Expression von GST-Fusionsproteinen wurde nach erfolgter Klonierung der entsprechenden Expressionskonstrukte in *E.coli* BL21-CodonPlus Zellen der Firma Stratagene eingebracht. Die Transformation erfolgte nach Angaben des Herstellers nach folgendem Protokoll.

50 µl kompetente BL21-Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 1 µl XL10-Gold-2-Mercaptoethanol versetzt. Es wurde 10 min auf Eis inkubiert, anschließend wurden 50-100 µg der Plasmid-DNA zugefügt und die Mischung 30 min auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte durch Hitzeschock bei 42 °C für 20 Minuten. Die Zellen wurden kurz auf Eis inkubiert, dann mit vorgewärmtem SOC-Medium (900µl) versetzt und 1 h bei 37 °C auf dem Schüttler bei 220 rpm inkubiert. Die Zellen wurden pelletiert, in 200 µl SOC-Medium resuspendiert und auf LB-Agar Selektionsplatten mit Ampicillin (50 µg/ml) ausplattiert und bis zum Erscheinen von einzelnen Kolonien bei 37 °C inkubiert.

SOB/SOC Medium:	20 g/l	Pepton (tryptisch verdaut)
	5 g/l	Hefeextrakt
	20 mM	Magnesiumchlorid
	10 mM	Natriumchlorid
	2,5 mM	Kaliumchlorid
	200 mM	Glukose (nur SOC Medium)

2.4.2.12 Transformation von *Synechocystis* sp. PCC6803

Ein geeigneter Weg zu funktionellen Analyse eines unbekannten Proteins ist die Mutation des entsprechenden codierenden Gens im Organismus und die anschließende Charakterisierung der spezifisch durch die Mutation verursachten Defekte oder Unterschiede zum Wildtyp-Organismus. Die natürliche Transformationskompetenz von *Synechocystis* sp. PCC6803 erleichtert die gezielte Mutation von Genen im Vergleich zu höheren Organismen deutlich und macht dieses Cyanobakterium zu einem der am häufigsten für Knockout-Experimente verwendeten Organismen.

Synechocystis sp. PCC6803 ist von Natur aus leicht durch exogene DNA zu transformieren (Grigorieva und Shestakov, 1982). Zur Transformation von *Synechocystis* sp. PCC6803 wurde ein modifiziertes Protokoll von Jianping Yu, 1993 und Williams, 1986 verwendet. Das Protokoll eignet sich zur Integration durch homologe Rekombination eines in einem Plasmidvektor wie z.B. pGEM-T vorliegenden Transformationskonstrukts in das Genom des Cyanobakteriums.

Eine in der logarithmischen Wachstumsphase befindliche Flüssigkultur von Wildtypzellen mit einer OD₇₃₀ von 0,8-1,0 wurde mit frischem BG-11 Medium auf eine OD₇₃₀ von 0,1 verdünnt. Die Kultur wurde 2-4 Tage unter Standardbedingungen bis zum Erreichen einer OD₇₃₀ von 0,3 kultiviert. 35 ml der Kultur wurden bei 3000 g und Raumtemperatur für 10 min im Ausschwingrotor pelletiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde mit BG-11 Medium auf eine OD₇₃₀ von 3,0 eingestellt, zur genaueren Bestimmung der OD₇₃₀ erfolgten die Messungen in geeigneter Verdünnung.

300 µl der Zellen wurden mit 15 µg der Plasmid-DNA, entweder in zirkulärer oder linearisierter Form vorliegend, versetzt und bei 30 °C für 2-4 Stunden unter reduzierten Lichtbedingungen und gelegentlichem kurzen Schütteln inkubiert. Die Transformationsmischung wurde im Anschluß auf BG-11 Agarplatten, jeweils 100 µl pro Platte, verteilt. Die Agarplatten wurden unter reduzierten Lichtbedingungen 2-3 Tage nach Standardbedingungen kultiviert.

Zur Selektion der transformierten Zellen wurden die Kulturplatten mit 0,8 % Agar mit einem Zusatz von 10 µg/ml Kanamycin überschichtet und weitere 2-3 Wochen bis zum Erscheinen einzelner Kolonien inkubiert. Die Kolonien wurden in BG-11 Flüssigmedium mit 10 µg Kanamycin überführt und nach Standardbedingungen kultiviert. Nach mindestens 5

Verdünnungszyklen bei steigender Antibiotika-Konzentration bis 50 µg/ml Kanamycin wurden die Cyanobakterien auf BG-11 Agarplatten mit 50 µg/µl Kanamycin ausgestrichen und einzelne entstandene Kolonien in Flüssigkultur überführt, anschließend analysiert und als Glycerinkultur bei -80 °C gelagert.

2.4.3 Biochemische Methoden

2.4.3.1 Proteinbestimmung

Die quantitative Bestimmung des Proteingehalts von Proben wurde mit dem Roti-Nanoquant Kit der Firma Roth nach einem modifizierten Protokoll nach Bradford, 1976 durchgeführt. Zur Proteinbestimmung wurde das Protokoll des Herstellers befolgt.

2.4.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine unterschiedlicher Größe konnten in einem Polyacrylamidgel nach einer Methode von Laemmli, 1970 aufgetrennt werden. Als Grundsubstanz für das Polyacrylamidgel wurde eine vorgefertigte Mischung aus Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid im Verhältnis 30:0,8 eingesetzt (ROTIPHORESE Gel 30, Firma Roth). Die aufzutrennenden Proteine wurden für 10 Minuten in SDS-Probenpuffer aufgeköcht, 5 Minuten bei 14.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand auf das Gel aufgetragen. Nach Auftragen der Proben wurden diese mit einer konstanten Stromstärke von 10-15 mA in das Sammelgel einlaufen gelassen und die Elektrophorese mit 30-40 mA fortgesetzt.

Sammelgel:	125 mM	Tris/HCl pH 6.8
	3,9 % (w/v)	Acrylamid
	0,1 % (w/v)	SDS
	0,001% (v/v)	TEMED
	0,1 % (w/v)	APS
Trenngel:	375 mM	Tris/HCl pH 8.8
	10-12 % (w/v)	Acrylamid

	30 % (w/v)	Saccharose
	0,1 % (w/v)	SDS
	0,001% (v/v)	TEMED
	0,05 % (w/v)	APS
SDS-Probenpuffer:	62,5 mM	Tris/HCl pH 6.8
	4 % (w/v)	SDS
	4 % (v/v)	2-Mercaptoethanol
	17,4 % (v/v)	Glycerin
	0,002 % (w/v)	Bromphenolblau
Elektrodenpuffer:	25 mM	Tris
	192 mM	Glycin
	0,1 % (w/v)	SDS

2.4.3.3 Anfärbung von SDS-Gelen

Die Anfärbung der durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine erfolgte durch 20 min Inkubation des kurz mit Wasser gewaschenen Gels in einer Färbelösung mit Coomassie Brilliant Blue für 10 Minuten. Anschließend erfolgte die Entfärbung der Gelmatrix in einer Entfärbelösung, bis der Hintergrund ausreichend entfärbt war.

Färbelösung:	50 % (v/v)	Methanol
	5 % (v/v)	Essigsäure
	0,25 % (w/v)	Coomassie Brilliant Blue R-250
Entfärbelösung:	28 % (v/v)	Isopropanol
	5 % (v/v)	Essigsäure

Alternativ wurde die Färbelösung RotiBlue der Firma Roth zusammen mit den entsprechenden Entfärbelösungen nach dem Protokoll des Herstellers verwendet.

Zur schonenden Anfärbung präparativer SDS-Gele fand eine Methode nach Prussak et al. (1989) Verwendung. Durch Inkubation mit 0,1 M Kaliumchlorid bei 4 °C für 3 h oder länger wurden die

Proteinbanden als weiße Präzipitat-Banden sichtbar und konnten zur nachfolgenden Elektroelution ausgeschnitten werden.

2.4.3.4 Elektroelution von Proteinen

Die Elution von Proteinen aus SDS-Gelen erfolgte durch Elektroelution. Die nach 2.4.3.3 mit Kaliumchlorid angefärbten Banden wurden ausgeschnitten und in einer Elektroelutionskammer *Elutrap Electroelution System* der Firma Schleicher & Schuell unter Verwendung von BT1 und BT2 Biotrap Membranen der Firma Schleicher und Schuell eluiert. Die Elution erfolgte in SDS-Elektrodenpuffer bei einer Spannung von 110 V und 25 mA über Nacht und ergab ein auf etwa 1 ml Volumen eingeeengtes Proteineluat, das mit geeigneten Mikrokonzentratoren bis zur gewünschten Konzentration weiter angereichert werden konnte.

2.4.3.5 Elektrochemischer Transfer von Proteinen (Westernblot)

Der elektrochemische Transfer von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen erfolgte im Halbtrockenverfahren nach einer Methode von Kyhse-Andersen, 1984 (diskontinuierliches System) oder einer Methode von Towbin et al., 1979 (kontinuierliches System).

Für den Transfer nach Towbin wurden 3 Lagen Filterpapier (Whatman 3MM) in Transferpuffer getränkt und auf die Anode gelegt. Darauf wurden die mit Transferpuffer äquilibrierte Nitrocellulose- oder PVDF-Membran und das Gel luftblasenfrei aufgelegt. Zum Abschluß folgten weitere 3 puffergetränkte Lagen Filterpapier und die Kathode.

Transferpuffer:	25 mM	Tris
	192 mM	Glycin
	20 % (v/v)	Methanol

Für den Transfer nach Kyhse-Andersen wurden 2 Lagen Filterpapier in Anodenpuffer I getränkt und auf die Anode gelegt. Ein in Anodenpuffer II getränktes Filterpapier und die in Anodenpuffer II äquilibrierte Transfermembran folgten, danach das in Kathodenpuffer äquilibrierte Gel und zum Abschluß drei ebenfalls in Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere sowie die Kathode.

Anodenpuffer I:	0,3 M	Tris / HCl pH 10.4
	20 % (v/v)	Methanol
Anodenpuffer II:	25 mM	Tris / HCl pH 10.4
	20 % (v/v)	Methanol
Kathodenpuffer:	25 mM	Tris / HCl pH 9.4
	20 % (v/v)	Methanol
	40 mM	ϵ -Aminocapronsäure

Der Transfer erfolgte für 45 min bis 1,5 h bei einer konstanten Stromstärke von 0,8 mA/cm² Gelfläche. Nach Abschluß des Blottens wurden die Proteine mit Färbelösung angefärbt und der Hintergrund anschließend mit Wasser entfärbt. Die Membran wurde mit 0,2 M NaOH entfärbt, gewässert und direkt weiterverwendet. Zur Lagerung wurden geblottete Transfermembranen aus Nitrocellulose kurz luftgetrocknet und bei -20 °C aufbewahrt, Blots auf PVDF-Membranen wurden zwischen zwei Lagen Filterpapier bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Färbelösung:	2 % (v/v)	Tinte Königsblau Fa. Pelikan
	1 % (v/v)	Essigsäure

2.4.3.6 Immunanfärbung mit Peroxidase

Die immunologische Identifikation von Proteinen erfolgte durch die Verwendung eines gegen das zu detektierende Protein gerichteten primären Antikörpers. An diesen primären Antikörper bindet spezifisch der mit dem Enzym Peroxidase aus Meerettich gekoppelte sekundäre Antikörper. Durch die Ausnutzung der enzymatischen Aktivitäts des sekundären Antikörpers ist es möglich, mit dem ECL System die entstehende Phosphoreszenz nachzuweisen und das gesuchte Protein zu detektieren.

Freie Bindungsstellen auf der Nitrocellulose- oder PVDF-Membran wurden durch einstündige Inkubation unter leichtem Schütteln in Blocking-Puffer abgesättigt. Der primäre Antikörper wurde in Blocking-Puffer 1:1000 oder geringer verdünnt und die Membran 1 h mit der Antikörperlösung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 10 min in Puffer TBS-T zum

Entfernen nicht gebundenen primären Antikörpers wurde die Lösung des Zweitantikörpers in Blocking-Puffer auf die Membran gegeben. Nach wiederum einstündiger Inkubation wurde durch dreimaliges Waschen mit Puffer TBS-T nicht gebundener sekundärer Antikörper entfernt und abschließend die Membran 5 min mit Puffer TBS-T oder Wasser gewaschen.

Das ECL SuperSignal West Pico Kit der Firma Pierce wurde nach Angaben des Herstellers verwendet, um die Enzymaktivität des Zweitantikörpers durch Phosphoreszenz nachzuweisen und durch Schwärzung von Röntgenfilm zu dokumentieren.

Puffer TBS / TBS-T:	100 mM	Tris / HCl pH 7.5
	0,9 % (w/v)	Natriumchlorid
	0,1 % (v/v)	Tween-20 (nur TBS-T)
Blocking-Puffer:	7 % (w/v)	Magermilchpulver in Puffer TBS-T

2.4.3.7 In situ Detektion von Proteinen in *Guillardia theta* (Fraunholz et al., 1998)

Die genaue Lokalisierung eines Proteins in der Zelle ist mithilfe verschiedener Möglichkeiten durchführbar. Eine bewährte Methode ist die Immunlokalisation, ausgehend von chemisch fixierten Ultradünnschnitten der zu untersuchenden Organismen. Mit spezifischen Antikörpern gegen das zu lokalisierende Protein und einer elektronenmikroskopischen Detektion über goldmarkierte Zweitantikörper können gesuchte Proteine eindeutig identifiziert werden. Voraussetzung für die Immunlokalisation ist das Vorhandensein eines spezifischen Antikörpers gegen das zu untersuchende Protein.

Zellen einer Kultur von *Guillardia theta* in der exponentiellen Wachstumsphase wurden durch Zugabe von Glutaraldehyd bis zu einer Endkonzentration von 0,8 - 1% fixiert. Anschließend erfolgte die Entwässerung durch Inkubation in Ethanol in mehreren Schritten bis zum Erreichen eines 100%-igen Ethanolgehalts. Die Zellen wurden in Lowicryl K4M Harz (Chemische Werke Lowi) nach Protokoll des Herstellers eingebettet. Es wurden Ultradünnschnitte angefertigt, diese wurden mit dem Antiserum gegen das zu detektierende Protein in einer Verdünnung von 1:300 bis 1:800 in PBS-Puffer inkubiert. Spezifisch gebundene Antikörper wurden durch Inkubation mit Gold-gekoppeltem Zweitantikörper (anti-Kaninchen IgG aus Ziege) in einer Verdünnung von 1:60 nachgewiesen. Ungebundener Antikörper wurde durch mehrmaliges Waschen mit PBS-

Puffer entfernt und die Ultradünnschnitte mit Uranylacetat- und Bleicitrat-Lösung nachkontrastiert. Die Detektion erfolgte durch die elektronenmikroskopische Visualisierung der Goldpartikel mit einem Transmissions-Elektronenmikroskop.

2.4.3.8 Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Die übliche Methode zur Gewinnung rekombinanten Proteins besteht darin, die Aminosäuresequenz des Proteins zusätzlich um ein Motif zu erweitern, das die Isolierung und Aufreinigung erleichtert. In der Regel werden hierzu GST (*Glutathion-Sepharose-Tag*) oder 6-fache Histidin-Motive verwendet, in beiden Fällen ist eine Aufreinigung über Affinitätschromatographie möglich. Zusätzlich kann durch spezifische Antikörper gegen die Motive eine immunologische Detektion des rekombinanten Proteins erfolgen.

Die Expression von rekombinantem GST-Fusionsprotein erfolgte nach der erfolgreichen Transformation des das zu exprimierende Konstrukt enthaltenden Expressionsvektors pGEX-5X-3 in Zellen von *E. coli* BL21 CodonPlus der Firma Stratagene nach dem Protokoll des Herstellers. Das rekombinante Protein wurde als Fusionsprotein mit einer N-terminalen GST-Domäne exprimiert (Abbildung 2.1).

Eine 200 ml Flüssigkultur des transformierten *E.coli* BL21 Stammes wurde bei 37 °C und 220 rpm auf einem Orbitalschüttler bis zum Erreichen einer optischen Dichte OD₆₀₀ von 0,8 inkubiert. Die Expression des GST-Fusionsproteins wurde durch die Zugabe von 2 mM IPTG induziert und die Kultur weitere 2,5 Stunden bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Die Zellen wurden durch 10 min Zentrifugation bei 5000 g und 4 °C geerntet und das Pellet in 5 ml kaltem Puffer PBS mit geeigneten Proteaseinhibitoren resuspendiert. Es wurden 25 µl Lysozymlösung (50 mg/ml) zugegeben und die Mischung unter gelegentlichem Rühren für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 20 µl einer 200 mg/ml Natriumdesoxycholat-Lösung zugegeben, gefolgt von 5 µl einer 5 mg/ml DNase-Lösung. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Nach 15 min Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4 °C wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 9 Volumen Puffer PBS mit 1 % (v/v) Triton X-100 und 10 mM EDTA resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde erneut wie zuvor zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in 9 Volumen Puffer PBS resuspendiert. Die einzelnen Fraktionen von Überstand und resuspendiertem Pellet wurden durch SDS-Gelelektrophorese analysiert oder direkt für die GST-Affinitätschromatographie verwendet.

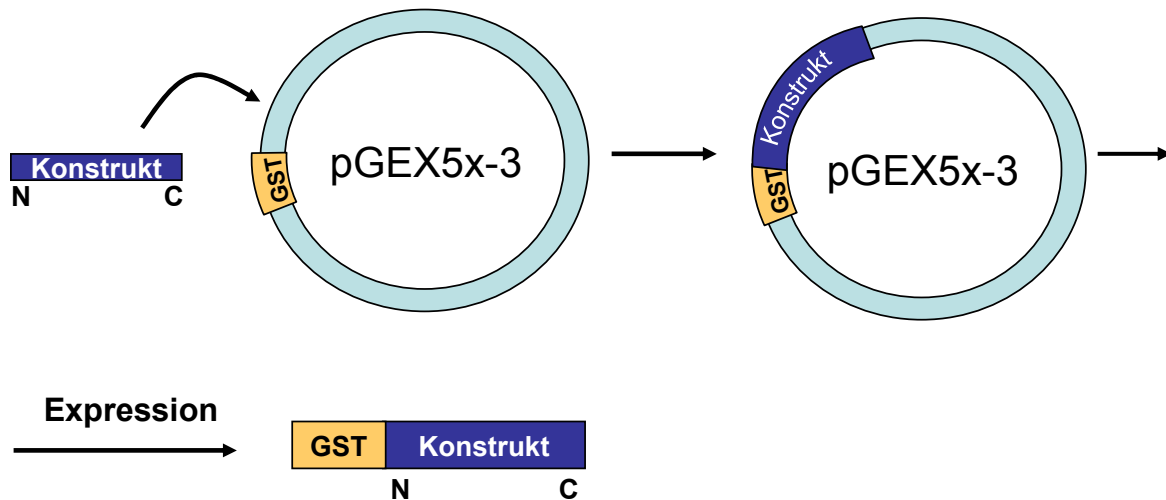


Abbildung 2.1. Schema der Herstellung von GST-Fusionsprotein.

Das Konstrukt wurde in den Expressionsvektor kloniert und rekombinantes Protein als Fusionsprotein mit N-terminalem GST exprimiert. N: N-Terminus des Konstrukts, C: C-Terminus des Konstrukts.

Die Aufreinigung rekombinantem GST-Fusionsproteins wurde mit Hilfe des *Bulk and ReadyPack GST-Purification* Kits der Firma Amersham Biosciences (GE Healthcare) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

2.4.3.9 Herstellung von Proteinextrakt aus *Guillardia theta*

Die Zellen einer einer 14 Tage alten Kultur (11 Kulturvolumen) von *Guillardia theta* wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 1000 g und Raumtemperatur im Ausschwingrotor pelletiert. Das Pellet wurde in 1 ml Extraktionspuffer resuspendiert und 10 min bei 96 °C im Wasserbad erhitzt. Die unlöslichen Bestandteile wurden durch 5-minütige Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4 °C abgetrennt und der lösliche Überstand zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Für die SDS-Gelelektrophorese vorgesehene Proben wurden direkt mit SDS-Probenpuffer versetzt und erneut 5 min bei 96 °C denaturiert.

Extraktionspuffer:	125 mM	Tris / HCl pH 6.8
	3 % (w/v)	SDS
	0,2 % (w/v)	Triton X-100

2.4.3.10 Eisenimport in *Synechocystis* sp. PCC6803 Zellen

Für die Analyse des Eisenimports in der *Aslr0076* Mutante und im Wildtyp wurden *Synechocystis* Zellen in der späten logarithmischen Wachstumsphase aus mehreren unter identischen Bedingungen (Kapitel 2.4.1.1) kultivierten Flüssigkulturen verwendet. Die Vorbereitung der Kulturen und der Import von radioaktivem $^{55}\text{Fe}^{3+}$ erfolgte nach einem Protokoll von Katoh (Katoh et al., 2000).

Eisenfreies BG-11 Kulturmedium wurde angefertigt, indem bei der Herstellung von BG-11 Medium (Kapitel 2.1.14.3) Magnesiumsulfat durch Kaliumsulfat ersetzt wurde. Weiterhin wurde Zitronensäure, Eisenammoniumcitrat, Calciumchlorid und die Spurenelemente-Mischung nicht beigefügt und das Medium durch Behandlung mit Chelex 100 Resin (Firma Bio-Rad) von polyvalenten Metall-Ionen befreit. Danach wurden die Spurenelemente sowie ultrareines Magnesiumchlorid und Calciumchlorid zugefügt.

Zur Vorbereitung von *Synechocystis* Zellen für den Eisenimport wurden die Zellen in normalem BG-11 Medium bis zum Erreichen der späten logarithmischen Wachstumsphase kultiviert. Die Zellen wurden in 20 mM TES / KOH pH 8.0 gewaschen und über Nacht in eisenfreiem BG-11 Medium kultiviert.

Für den Eisenimport wurden die Zellen erneut in 20 mM TES / KOH pH 8.0 gewaschen und in eisenfreiem BG-11 Medium auf eine Konzentration von etwa 2×10^9 Zellen / ml konzentriert. Radioaktives Eisen wurde in Form von $^{55}\text{FeCl}_3$ zugegeben, die Proben mit 1 mM Ferrozine (Sigma-Aldrich) versetzt und bei 30 °C und 200 rpm im Schüttler inkubiert.

Die Aufnahmereaktion wurde durch Inkubation auf Eis und Zentrifugation bei 4 °C gestoppt, das Pellet zweimal mit 20 mM TES / KOH mit 10 mM EDTA gewaschen. Anschließend wurde die inkorporierte Radioaktivität, die proportional zur Aufnahme von radioaktivem Eisen ist, am Szintillationszähler gemessen.

2.4.3.11 Bestimmung des Chlorophyllgehalts von *Arabidopsis thaliana*

Die Messung des Chlorophyllgehalts von *Arabidopsis thaliana* (Chl_a und Chl_b) erfolgte durch die Extraktion des Chlorophylls aus Blattbewebe mit DMF. 10 Proben von je 100 mg frisch

geerntetem Blattgewebe wurden mit 10 ml DMF extrahiert. Die Extraktion erfolgte für 48 h bei einer Temperatur von 4 °C im Dunklen. Die Absorption der Extraktionslösung jeder Probe wurde bei 647 und 664 nm gemessen. Der Gehalt an Chlorophyll ergab sich aus folgender Formel (Inskeep und Bloom, 1985):

$$\text{Chl}_{\text{Gesamt}} (\text{mg/L}) = 17.9 * A_{647} + 8.08 * A_{664}$$

2.4.4 In vivo Lokalisation von *Arabidopsis thaliana* ATNAP6

Die Beobachtung der in vivo Lokalisation eines Proteins in der Zelle bietet gegenüber der klassischen elektronenmikroskopischen Untersuchung immunologisch markierter Proteine gewisse Vorteile. Die für die elektronenmikroskopische Untersuchung notwendige Fixierung und Einbettung der Zellen und die damit verbundenen potentiellen Probleme wie die mögliche Zerstörung von Proteinkomplexen kann Entfallen. Nachteilig ist jedoch die Limitierung der optischen Auflösung durch die bei der in vivo Beobachtung durch Lichtmikroskopie verwendete Optik und die Wellenlänge des Lichts, dies erschwert die Untersuchung feinsten Strukturen, die durch Elektronenmikroskopie zugänglich sind.

Eine neue Möglichkeit zur in vivo Markierung von Proteinen bot sich mit der Entdeckung des Grün Fluoreszierenden Proteins (GFP) aus der Hydromeduse *Aequorea victoria*. Dieses Protein von 238 Aminosäuren kann mit blauem Licht angeregt werden und emittiert grünes Licht mit einem Maximum bei einer Wellenlänge von 510 nm. Vorteilhaft ist die hohe thermische und pH Stabilität des kompakten GFP.

Die Struktur besteht aus einer kompakten, Faß-ähnlichen antiparallelen Anordnung von 11 β -Faltblättern und einer längeren Helix, in deren Mitte die chromophore Gruppe enthalten ist.

Durch die Fusionierung von beliebigen Proteinen an den C- oder den N-Terminus von GFP lässt sich dieses als gut geeigneter Marker für in vivo Beobachtungen einsetzen.

Die Klonierung einer Gensequenz in einen geeigneten GFP-Expressionsvektor wird dabei von der Integration des Plasmids in das Wirtsgenom gefolgt. Anschließend kann die Expression des Fusionsproteins durch die Anregung der GFP-Fluoreszenz durch Licht der entsprechenden Wellenlänge mikroskopisch detektiert werden.

2.4.4.1 Transiente Transformation von *Arabidopsis thaliana* Mesophyllzellkulturen

Zur Protoplastierung und transienten *in vivo* Überexpression von GFP-Fusionsproteinen in *Arabidopsis thaliana* Zellkulturen wurde ein modifiziertes Protokoll von Altmann et al., 1992 verwendet.

2.4.4.2 Herstellung von Protoplasten

50 ml einer *Arabidopsis* Mesophyllzellkultur wurden bei 600 g und 22 °C für 5 min in einem Ausschwingrotor pellettiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Das Zellpellet wurde in 35 ml Enzymlösung resuspendiert und die Suspension gleichmäßig auf drei sterile Petrischalen verteilt. Die Petrischalen wurden abgedichtet und im Dunkeln bei 22 °C und 40 rpm für 16 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellsuspensionen in ein steriles Reaktionsgefäß überführt und bei 700 g und 22 °C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml Puffer W5 resuspendiert. In einer geeigneten Thoma-Zählkammer wurde die Zelldichte einer 1:20 verdünnten Probe bestimmt. Die Zellen wurden für mindestens 30 min auf Eis inkubiert und danach bei 600 g und 22 °C pellettiert, in Magnesium-Mannitol-Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die Konzentration der Zellsuspension wurde auf $1,7 \times 10^7$ Zellen/ml durch Verdünnen oder Konzentrieren in Magnesium-Mannitol Puffer eingestellt.

Enzymlösung pH 5.5:	0,4 M	Mannitol
	8 mM	CaCl ₂ x 2H ₂ O
	0,01 g/ml	Cellulase Onozuka R-10
	0,0025 g/ml	Macerozym R-10
Puffer W5 pH 5.8:	0,15 M	Natriumchlorid
	0,125 M	CaCl ₂ x 2H ₂ O
	5 mM	Kaliumchlorid
	5 mM	Glukose

Magnesium-Mannitol-	0,4 M	Mannitol
Puffer pH 5.6:	15 mM	Magnesiumchlorid
	5 mM	MES

2.4.4.3 Transformation von *Arabidopsis thaliana* Protoplasten

Als Transformationsvektor wurde pAVA393 (von Arnim et al., 1998) verwendet, dieser Vektor dient zur Expression von Fusionsproteinen mit einer am C-Terminus befindlichen GFP-Proteindomäne.

Pro Transformationsansatz wurden 30 µg der entsprechenden Vektor-DNA verwendet. Diese wurde in einem sterilen Zellkulturröhrchen mit 5 µl frisch denaturierter Carrier-DNA Lösung (10 mg/ml Heringsperma-DNA) vermischt. Anschließend wurden 300 µl der Protoplasten mit einer Konzentration von $1,7 \times 10^7$ Zellen/ml zugegeben und mit der DNA vermischt. Es wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, danach wurden 300 µl PEG-CMS Lösung zugegeben und durch vorsichtiges Schütteln gemischt. Die Mischung wurde 30 min bei Raumtemperatur aufbewahrt. 8 ml Puffer W5 wurden durch tropfenweise Zugabe unter ständigem vorsichtigem Mischen über einen Zeitraum von 10 min zugegeben. Die Probe wurde bei 600 g und 22 °C für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 5 ml einer Mischung aus 4,5 ml 0,5 M Mannitol und 0,5 ml Puffer W5 resuspendiert und erneut abzentrifugiert. 12 ml B5 Medium wurden zugegeben, das Pellet wurde resuspendiert und der gesamte Ansatz in eine sterile Petrischale gegeben. Die Zellen wurden über Nacht im Dunkeln bei 22 °C ohne Schütteln inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Zellen aus der Petrischale in ein steriles Kulturröhrchen überführt, einmal bei 600 g und 22 °C 5 min pelletiert und in 2 ml frischem B5 Medium resuspendiert. Direkt anschließend wurde am KLSM die erfolgreiche Transformation überprüft.

PEG-CMS Lösung:	0,4 M	Mannitol
pH 8.0	0,1 M	Ca(NO ₃) ₂
	0,4 g/ml	Polyethylenglykol 6000
B5 Medium pH 5.8:	3,2 mg/ml	Gamborgs B5 + Vitamine
	72,6 mg/ml	Glukose

2.4.4.4 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie zur Detektion von GFP-Fusionsproteinen

Transformierte Protoplasten wurden mit einem Leica TCS SP2 Konfokalen Laser Scanning Mikroskop (KLSM) der Firma Leica untersucht. Als Objektive wurden ein HCX PL APO 40x/1,25-0,75 Oil CS oder ein PL APO 63x/1,32-0,60 Oil Ph3 CS Öl-Immersions-Objektiv verwendet. Die GFP- und Chlorophyll-Fluoreszenz wurde mit einem Argon/Krypton Laser bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt. Ein Strahlteiler TD 488/543/633 und zwei verschiedene Photomultiplier mit einer Bandbreite von 500-520 nm und 625-720 nm ermöglichten die Detektion von GFP- und Chlorophyll-Fluoreszenz.

Die Bilder wurden mit der Leica LCS Software aufgenommen und mit Microsoft Powerpoint in die Abbildungen übernommen.

2.4.5 Genchip Microarray-Expressionsanalyse (Affymetrix)

Die Analyse von mRNA-Expressionsleveln mithilfe der Microarray Technologie beruht, ähnlich wie die klassischen Techniken des Northern- und Southern-Blottings, auf der gegenseitigen Bindung von komplementären einzelsträngigen Oligonukleotiden.

Zur Analyse einer großen Anzahl von Genen finden sogenannte Genchip-Microarrays Verwendung. Zur Expressionsanalyse von *atnap6* wurde der ATH1 Microarray der Firma Affymetrix verwendet (Abbildung 2.2).

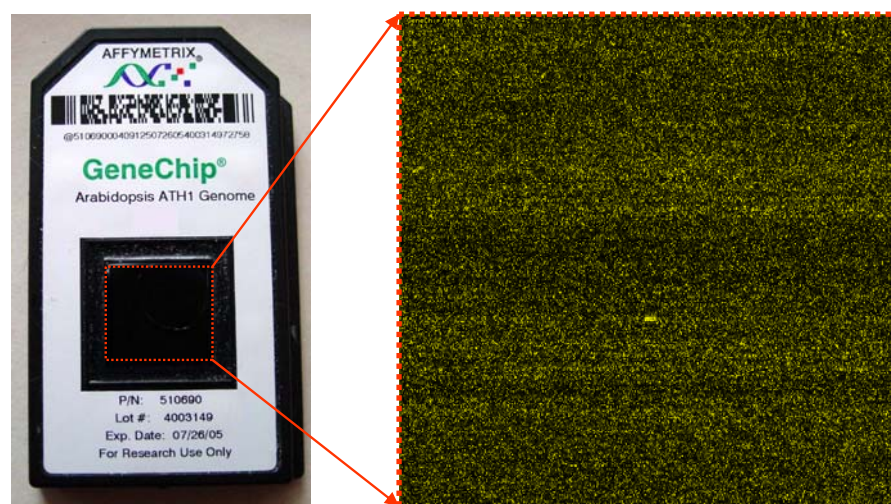


Abbildung 2.2. Affymetrix Arabidopsis ATH1 Genchip.

Der markierte Bereich kennzeichnet die eigentliche Chipfläche mit den aufgetragenen Oligonukleotid-Sonden. Rechtes Bild: Chipfläche nach Hybridisierung mit Biotin-markierter cRNA von *atnap6* und Detektion der Fluoreszenz. Jeder Punkt repräsentiert eine *probe cell*.

Bei der Herstellung dieses Genchips werden auf einem Glasträger für jedes zu untersuchende Gen 11 verschiedene spezifische Sonden von 25 Nukleotiden Länge („*probes*“) in verschiedenen Bereichen („*probe cells*“) des Trägers synthetisiert. Jede *probe cell* enthält mehrer hunderttausend Kopien des jeweiligen Oligonukleotids.

Der Genchip ATH1 enthält Sonden, die etwa 24.000 verschiedene Gene von *Arabidopsis thaliana* repräsentieren. Dies deckt den überwiegenden Teil der derzeit in der TIGR (The Institute for Genome Research) Datenbank vorhandenen Gensequenzen von *Arabidopsis* ab.

Die Expressionslevel der auf dem Chip enthaltenene Gene wurden gemessen, indem ausgehend von einer Gesamt-RNA Präparation des zu untersuchenden Gewebetyps zunächst cDNA und anschließend Biotin-markierte cRNA unter Befolgung des Herstellerprotokolls (GeneChip Expression Analysis Technical Manual, Affymetrix 2004) hergestellt wurde.

Die cRNA wurde fraktioniert und mit dem Microarray hybridisiert. Mit einem Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugat wurde die cRNA immunologisch detektiert und anhand der Emission des emittierten Lichts bei 570 nm Wellenlänge im zugehörigen Scanner (Affymetrix) quantifiziert (GeneChip Expression Analysis Technical Manual, Affymetrix 2004).

Die nachfolgende Annotierung und statistische Auswertung der Meßdaten erfolgte mit der Software dChip Ver. 1.3 (<http://biosun1.harvard.edu/complab/dchip/>) und dem Statistikprogramm R Ver. 2.0.1 (<http://www.r-project.org>).

2.4.6 Hefe 2-Hybrid Interaktionsanalyse

Zur Identifizierung potentieller Interaktionspartner von ORF467 aus *Guillardia theta* bzw. ATNAP6 aus *Arabidopsis thaliana* wurden Interaktionsanalysen mit dem Hefe 2-Hybrid System durchgeführt. Das zugrunde liegende Prinzip (Abbildung 2.4) beruht auf der Expression des mit einer DNA-bindenden Domäne fusionierten zu untersuchenden Proteins („Bait“) und der Aktivierung der Transkription von Reportergenen bei der spezifischen Interaktion mit einem mit einer Aktivierungsdomäne versehenen Protein aus einer cDNA Bibliothek („Prey“).

Die Interaktionsanalyse von ATNAP6 erfolgte nach dem Clontech Matchmaker GAL4 Two-Hybrid System 2 nach den Protokollen des Herstellers. Die Baitkonstrukte wurden in den Vektor pAS2-1 kloniert und dieser in den Hefestamm Y190 (Clontech) transformiert.

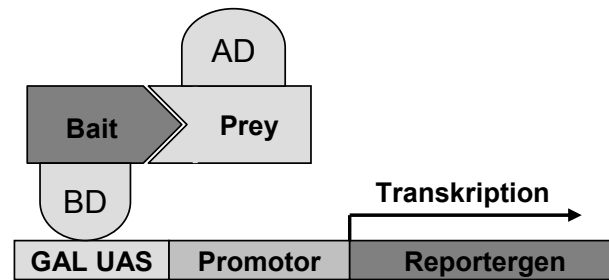


Abbildung 2.3. Prinzip des 2-Hybrid Systems.

Die spezifische Interaktion von Bait- und Prey-Protein führt zur Transkription von Reportergenen. AD: Aktivierungsdomäne, BD: DNA-Bindungsdomäne, UAS: „Upstream“ Aktivierungssequenz. (Quelle: BD-Biosciences / Clontech *Matchmaker GAL4 Two-Hybrid System 3 & Libraries User Manual*, Ausgabe Juni 1999).

Als Bibliothek wurde eine cDNA Bibliothek (ABRC-Code CD4-22) aus *Arabidopsis thaliana* verwendet. Diese wurde ursprünglich hergestellt von Jungmook Kim und Athanasios Theologis und wurde über das *Arabidopsis Biological Resource Center* (ABRC, www.biosci.ohio-state.edu/~plantbio/Facilities/abrc/abrchome.htm) bezogen. Die cDNA wurde in den Vektor pACT2 kloniert.

Zur Identifikation von Interaktoren wurden der Hefestamm Y190 mit dem Baitplasmid transformiert und anschließend eine Transformation mit dem Preyplasmid durchgeführt. Die Klone mit potentieller Interaktion wurden durch die Aktivierung des Reportergens *HIS3* auf Selektionsmedium identifiziert und anschließend auf die Aktivierung des zweiten Reportergens *lacZ* durch ein Filter-Lift-Assay überprüft. Die Preyplasmide wurden isoliert und die Nukleotidsequenzen der putativen Interaktoren durch Sequenzierung bestimmt.

3 Ergebnisse

3.1 *Guillardia theta* ORF467

3.1.1 ORF467 ist homolog zu Proteinen aus Cyanobakterien, Bakterien und Pflanzen

Die Analyse der Nukleotidsequenz von *orf467* (*open reading frame* = offener Leserahmen) zeigte, dass *orf467* für ein Protein von 467 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 53,9 kDa kodiert.

Eine Datenbankanalyse zur Identifizierung von Proteinen mit homologer Sequenz in anderen Organismen wurde mit BlastP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST>) durchgeführt. Ein Alignment der homologen Proteine zeigte Proteine aus Bakterien und Pflanzen als nächste Verwandte von ORF467. Der Sequenzvergleich von ORF467 mit ausgewählten homologen Proteinen aus *Synechocystis* sp. PCC6803, *Escherichia coli* und *Arabidopsis thaliana* (Abbildung 3.1) ließ vor allem in der C-terminalen Hälfte der Proteine eine hohe Homologie der Aminosäure-Sequenzen erkennen. Gegenüber den bakteriellen Homologen wiesen die Aminosäure-Sequenzen von *Guillardia theta* und *Arabidopsis thaliana* einen verlängerten N-Terminus auf.

Im Fall des homologen Proteins von *Arabidopsis thaliana* At1g32500 konnte durch ChloroP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP>) und TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>) ein topogenes Signals in Form eines Transitpeptids vorausgesagt werden.

Die N-terminale Extension von ORF467 zeigte bei der Analyse mithilfe der erwähnten computergestützten Algorithmen keine Merkmale von klassischen plastidären Transitpeptiden. Aufgrund der Ausrichtung dieser Algorithmen auf Pflanzen- und Grünalgenproteine und der wenigen bekannten Sequenzen von plastidär lokalisierten und kernkodierten Rotalgenproteinen ist die Vorhersage einer plastidären Lokalisation für Nucleomorph-kodierte Proteine von *Guillardia theta* erschwert.

Es wurde vermutet, dass es sich bei der N-terminalen Extension von ORF467 um ein *Guillardia theta* spezifisches topogenes Signal für den Import in die Plastide handelt. Nucleomorph-kodierte Proteine mit bekannter plastidärer Lokalisation besitzen eine N-terminale Extension, die für den Import in die Plastide notwendig ist (Wastl und Maier, 2000). Diese N-terminale Extension

Die Sequenzvergleiche der N-terminalen Extensionen von ORF467 und anderen Nucleomorph-kodierten plastidärer Proteinen wie Rubredoxin und FtsZ und den putativen plastidären Proteinen ORF467, ORF228 und ORF496 zeigte das Vorhandensein des MFXN Motivs bei ORF467, ORF496 und Rubredoxin (Abbildung 3.2).

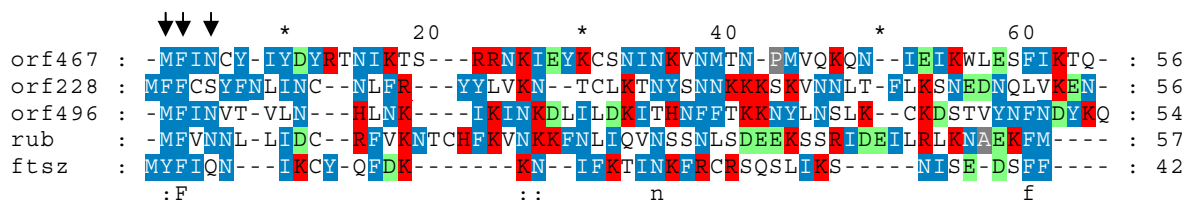


Abbildung 3.2. N-terminale Extensionen Nucleomorph-kodierter Proteine.

Aminosäuren-Alignment der N-terminalen Extensionen von ORF467, ORF228 und ORF496 mit den N-terminalen Extensionen der nachgewiesenen plastidär lokalisierten Proteine Rubredoxin und FtsZ. Das MFXN Motiv ist durch Pfeile gekennzeichnet. Roter Hintergrund: Basische Aminosäure (D, E); Hellgrüner Hintergrund: Saure Aminosäure (H,R,K). Blau hinterlegte Aminosäuren sind durch AT-reiche Codons kodiert, grau hinterlegte durch GC-reiche Codons.

Die Analyse der N-terminalen Sequenz von ORF467 mit dem PlasmoAP Algorithmus zur Vorhersage von Apicoplasten-lokalisierten Proteinen in *Plasmodium falciparum* (<http://www.plasmodb.org/cgi-bin/plasmoap.cgi>) sagte die Anwesenheit eines Transitpeptids zur Translokation in den Apicoplasten voraus. Sowohl das Verhältnis von sauren zu basischen Aminosäuren innerhalb der ersten 22 Aminosäuren, wie auch die Anwesenheit einer etwa 40 Aminosäuren umfassenden Region, die mit Lysin und Asparagin angereichert ist, entsprachen dem für *Plasmodium falciparum* typischen Erscheinungsbild eines Apicoplasten-gerichteten Transitpeptids (Foth et al., 2003).

3.1.2 ORF467 ist ein exprimiertes *Guillardia theta* Protein

Für die Herstellung eines ORF467-GST-Fusionsproteins wurde die ORF467 kodierende Nukleotidsequenz mit den Oligonukleotid-Primern ex467for und ex467rev durch PCR amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde durch Sequenzierung auf eventuelle Fehler überprüft. Das fehlerfreie amplifizierte Produkt wurde anschließend über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *SalI* in den Expressionsvektor pGEX-5X-3 kloniert. Der Expressionsvektor mit dem

Konstrukt wurde in *E.coli* BL-21 Zellen transformiert (Kapitel 2.4.2.11) und rekombinantes ORF467-GST-Fusionsprotein exprimiert. Die Isolierung und Aufreinigung des rekombinanten GST-Fusionsproteins erfolgte nach Kapitel 2.4.3.8.

Das isolierte ORF467-GST-Fusionsprotein wurde zur Immunisierung eines Kaninchens durch die Firma Eurogentec eingesetzt. Das gewonnene Antiserum wurde für die immunologische Detektion von ORF467 in Gesamtproteinfraktionen von *Guillardia theta* verwendet.

Proteinextrakt von *Guillardia theta* wurde nach Kapitel 2.4.3.9 isoliert und auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt (Kapitel 2.4.3.2). Die Proteine wurden durch Western-Blotting auf Nitrocellulose-Membran übertragen. Mit Hilfe des Antiserums konnte durch immunologische Detektion eine Proteinbande mit der zu erwartenden Masse von ORF467 nachgewiesen werden (Abbildung 3.3).

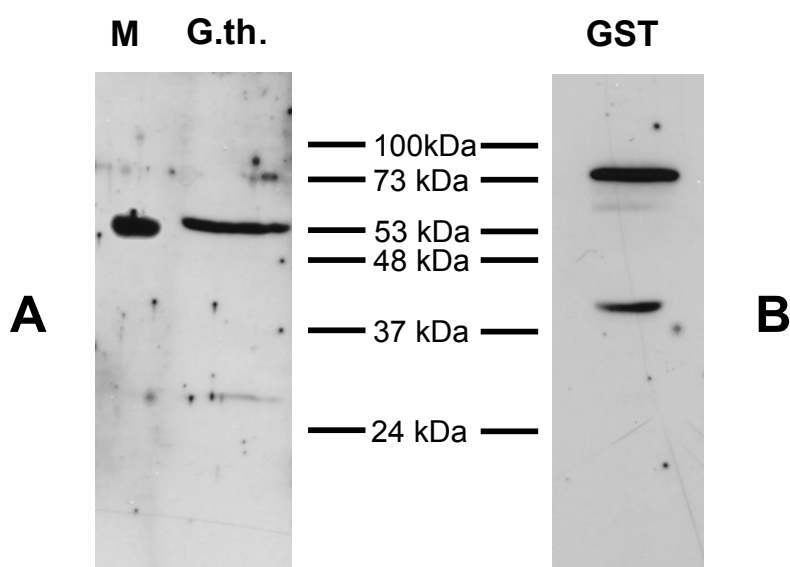


Abbildung 3.3. Immundetektion von ORF467.

A: Immundetektion von ORF467 in *Guillardia theta*. Proteinextrakt von *Guillardia theta* wurde durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf Nitrocellulose geblottet. Der Westernblot wurden mit Antiserum gegen rekombinantes ORF467-GST-Fusionsprotein in Verdünnung 1:1000 inkubiert, als Zweitantikörper wurde anti-rabbit IgG aus Ziege, gekoppelt mit Peroxidase verwendet. M: Markerspur (Anfärbung der 53 kDa Markerbande durch sekundären Antikörper verursacht), G.th: *Guillardia theta* Proteinextrakt.

B: Immundetektion von rekombinantem ORF467-GST-Fusionsprotein nach Aufreinigung. Immunanfärbung mit anti-GST Erstantikörper aus Maus in Verdünnung 1:1000, Zweitantikörper anti-Maus IgG aus Kaninchen, Peroxidase-gekoppelt. GST: Rekombinantes GST-Fusionsprotein von ORF467.

In der isolierten Gesamtprotein-Fraktion von *Guillardia theta* wird eine Bande mit einer molekularen Masse von 53 kDa von dem Antiserum gegen ORF467 markiert. Da die berechnete molekulare Masse von ORF467 in *Guillardia theta* 53,9 kDa beträgt, ist mit dem verwendeten Antiserum somit vermutlich ORF467 in der Gesamtprotein-Fraktion von *Guillardia theta* nachgewiesen worden.

3.1.3 ORF467 ist in der Plastide von *Guillardia theta* lokalisiert

Mit Hilfe des Antiserums gegen ORF467 konnten Ultradünnschnitte von in Lowicryl-Harz eingebetteten *Guillardia theta* Zellen immunologisch nach auf das Vorhandensein von ORF467 überprüft werden. Dazu wurden die Ultradünnschnitte mit verdünntem Antiserum gegen ORF467 inkubiert und anschließend mit Gold-gekoppeltem sekundären Antikörper behandelt (Kapitel 2.4.3.7). Im Elektronenmikroskop konnten die elektronendichten Goldpartikel des sekundären Antikörpers detektiert werden und traten als schwarze Punkte in den Abbildungen hervor (Abbildung 3.4).

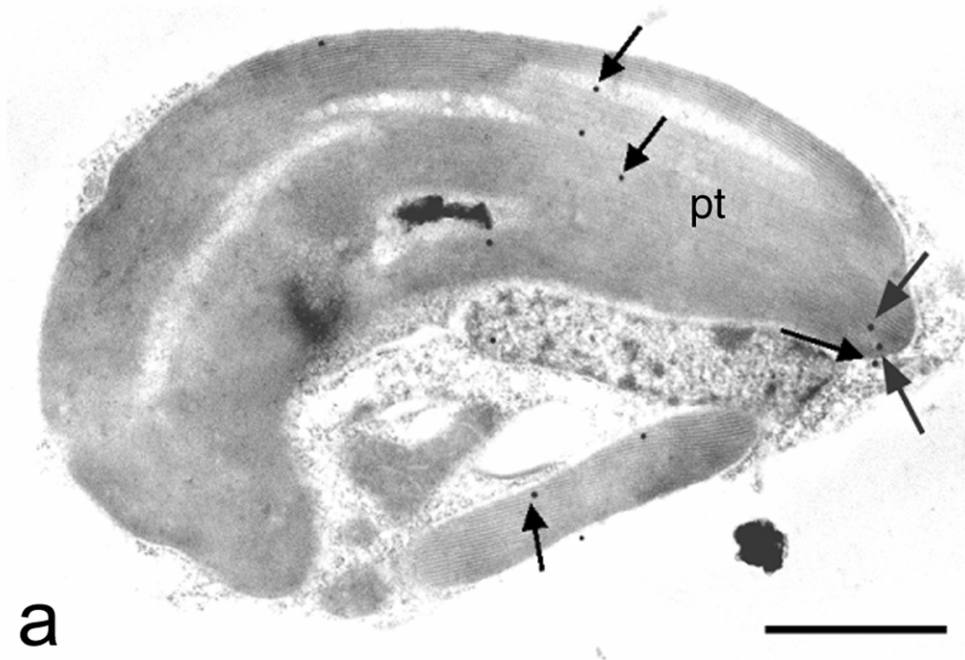


Abbildung 3.4. In situ Lokalisation von ORF467 in *Guillardia theta*.

a: Immundetektion von ORF467 in Zellen von *Guillardia theta*. Ultradünnschnitte von *Guillardia theta* wurden in Lowicryl eingebettet und mit Antiserum gegen ORF467 in Verdünnung 1:300 inkubiert. Goldmarkiertes anti-Kaninchen IgG aus Ziege in Verdünnung 1:60 wurde als Zweitantikörper verwendet, um den Erstantikörper zu detektieren. Elektronenmikroskopische Aufnahme, Pfeile zeigen ausgewählte Goldmarkierungen. Maßstab 1 μm .

In Abbildung 3.4 a ist die eindeutige plastidäre Lokalisation von ORF467 zu erkennen. Die Markierungen liegen innerhalb der Plastide. Nach Analyse zahlreicher weiterer elektronenmikroskopischer Aufnahmen anderer Zellen fiel zudem eine Häufung der beobachteten Goldmarkierungen im Bereich der Plastidenspitzen auf.

3.1.4 ORF467 besitzt eine ungewöhnliche Sekundärstruktur

Im Rahmen der Untersuchungen zu eventuellen Transmembrandomänen von ORF467 fiel auf, dass es sich bei ORF467 um ein Protein mit einer ungewöhnlichen Sekundärstruktur handelt. Nach in silico-Analysen mit dem JPRED-Algorithmus (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/~www-jpred/>) wurde innerhalb der Proteinsequenz ein ausgedehnter Bereich von Beta-Faltblattstrukturen vorausgesagt (Abbildung 3.5).

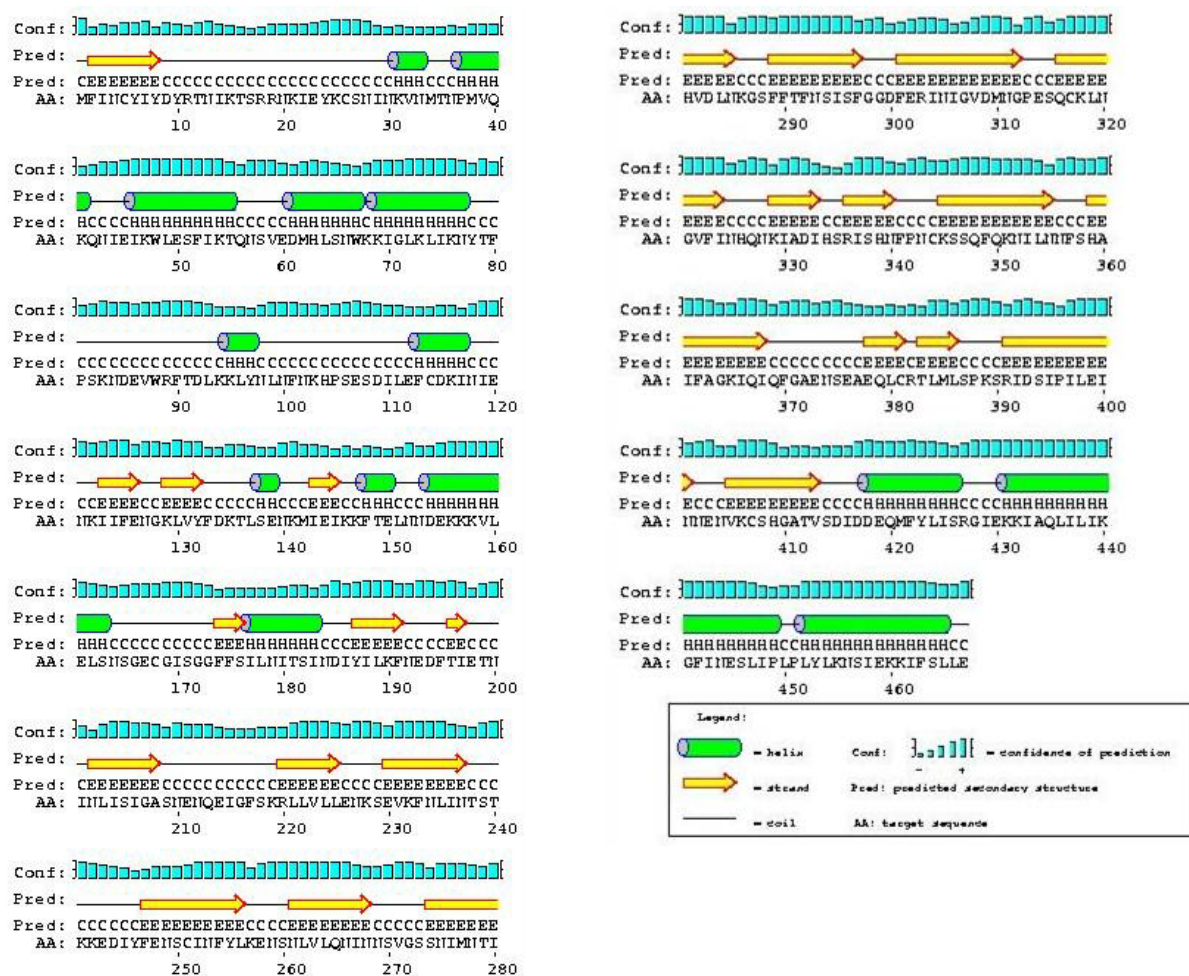


Abbildung 3.5. In silico Sekundärstrukturanalyse von ORF467.

Die Analyse der Aminosäuresequenz erfolgte mit JPRED. Grüne Zylinder zeigen α -helikale, gelbe Pfeile zeigen β -Faltblatt Domänen an. Blaue Balken geben Wert für die Zuverlässigkeit der Vorhersage an.

Transportprozessen, der Bildung von Membranporen bis hin zu Proteasen und Lipasen (Wimley, 2003).

Da sowohl ORF467 (SufD) als auch YCF24 (SufB) eine Proteindomäne mit gleicher Sekundärstruktur besitzen und SufC eine nachgewiesene ATPase Aktivität besitzt (Nachin et al., 2003), war es naheliegend, auch ORF467 als mögliches β -Barrel Protein und potentielle Membrankomponente des postulierten SufBCD ABC-Transporters anzusehen.

3.1.5 ORF467 ist kein β -Barrel Membranprotein

Die durchgeführten in silico-Analysen zur Vorhersage von α -helikalen Transmembran-Domänen in ORF467 mit den Algorithmen TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), SOSUI (<http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosui/menu0.html>) und HMMTOP (<http://www.enzim.hu/hmmtop/>) ergaben keine Hinweise auf ein Vorliegen von Transmembrandomänen.

Die Voraussage von β -Barrel Proteinstrukturen ausgehend von der Aminosäuresequenz eines Proteins ist mit zahlreichen Schwierigkeiten behaftet. Im Gegensatz zur Analyse von klassischen α -helikalen Membranproteinen existiert kein allgemein gültiger Algorithmus zur Identifikation von β -Barrel Proteinen (Liu et al., 2002; Martelli et al., 2002).

In einer Kooperation im Rahmen des Transregio 1 (SFB TR1 der Deutschen Forschungsgemeinschaft) wurden in Zusammenarbeit mit Enrico Schleiff Strukturberechnungen für ORF467 unter Verwendung von auf Proteine der äußeren Chloroplastenmembran von *Arabidopsis thaliana* optimierte Algorithmen durchgeführt.

	ORF467	Grenzwert
Beta barrel score (BBS)	0,265	$\geq 0,7$
Beta barrel number (BBN)	10	>13
BBN / aa	0,021	$>0,015$ wenn BBN >13

Tabelle 3.7. In silico β -Barrel Vorhersage für ORF467.

Berechnungen wurden nach Schleiff et al., 2003 durchgeführt. BBS: *Beta barrel score*, BBN: *Beta barrel number*. Grenzwerte für β -Barrel Proteine nach Kriterien von Schleiff et al.

Die für ORF467 durchgeführten Berechnungen ergaben jedoch, dass es sich bei ORF467 mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht um ein β -Barrel Protein handelt (persönliche Kommunikation, Enrico Schleiff), da die erforderlichen Grenzwerte bei den Modellrechnungen nicht erreicht wurden (Tabelle 3.7).

3.1.6 ORF467 besitzt eine β -Helix Struktur

Analysen zur Vorhersage der tertiären Proteinstruktur von ORF467 wurden mit dem Programm 3D-PSSM (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~3dpssm/>) durchgeführt. Anhand von Sequenzhomologien zu Proteinen mit bekannter Kristallstruktur wurden für ORF467 Strukturähnlichkeiten zu Concanavalin A (PDB Nummer: 3cna) aus Jackbohne (*Canavalia ensiformis*) berechnet. Die Struktur dieses Proteins weist eine antiparallele β -Faltblatt Konformation auf, die Homologien zu dem vorhergesagten β -Faltblatt von ORF467 besitzt.

Im Laufe der vorliegenden Arbeit wurde die Kristallstruktur des ORF467 Homologen SufD aus *Escherichia coli* veröffentlicht (Abbildung 3.8).

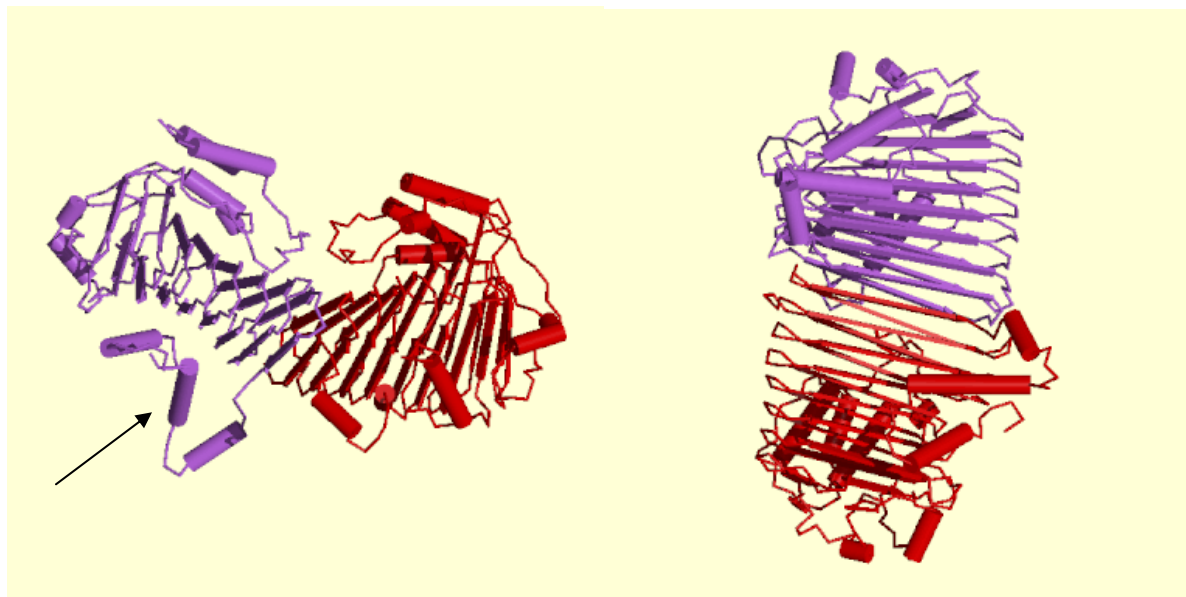


Abbildung 3.8. Kristallstruktur von SufD aus *E.coli*.

Dargestellt ist jeweils ein Dimer, bestehend aus zwei monomeren Proteinen (violett bzw. rot). β -Faltblatt Strukturen sind durch Pfeile, α -Helix Strukturen durch Zylinder dargestellt. Der C-Terminus eines Proteins ist durch einen schwarzen Pfeile gekennzeichnet. PDB Nummer: 1vh4.

Die ermittelte Kristallstruktur bestätigte die meisten der hier durchgeführten Strukturanalysen. Die einzige Abweichung zu den hier beschriebenen Daten bestand im Vorliegen einer parallelen β -Faltblattstruktur anstelle der vorhergesagten antiparallelen Struktur.

Die durchgeführten Sekundärstrukturanalysen zeigten eine hohe Übereinstimmung (siehe Abbildung 3.5 und 3.6) mit der gemessenen Kristallstruktur. Die Monomere des Proteins sind mit dem C-terminalen Ende des parallelen β -Faltblatts zu Dimeren verbunden, die drei α -Helices des C-Terminus ragen aus der Struktur hervor (Abbildung 3.8, siehe Pfeil).

Aufgrund der hohen Sequenzhomologien von *G.theta* ORF467 und *E.coli* SufD (siehe Abbildung 3.1) ist davon auszugehen, dass ORF467 ebenfalls eine parallele β -Faltblattstruktur aufweist und die Kristallstruktur des *E.coli* SufD ein gutes Abbild der Struktur von *G.theta* ORF467 darstellt.

3.1.7 2-Hybrid Interaktionsanalyse von ORF467 aus *Guillardia theta*

Für die 2-Hybrid-Analyse wurden zwei verschiedene Konstrukte von *orf467* (*sufD*) als Bait verwendet (Abbildung 3.9). Die Konstrukte deckten den Bereich der β -helikalen Domäne und des C-Terminus von ORF467 ab. Die Konstrukte wurden jeweils in den Vektor pGBKT7 (Clontech / BD Biosciences) kloniert, diese wurden in den Hefestamm AH109 (Clontech) transformiert. Als Prey-Bibliothek stand eine cDNA-Bibliothek aus *Guillardia theta* zur Verfügung, die cDNA dieser Bibliothek wurde als Fusionskonstrukte mit der AD-Domäne in den Vektor pGADT7 kloniert und in den Hefestamm Y187 transformiert.

Die Interaktionsanalyse erfolgte nach Kapitel 2.4.6. und Protokollen des Herstellers. Putative positive Interaktoren wurden identifiziert, indem aus Klonen, die alle drei Reportergene aktiviert hatten, die Prey-Plasmide isoliert und die Nukleotidsequenzen durch Sequenzierung festgestellt wurden.

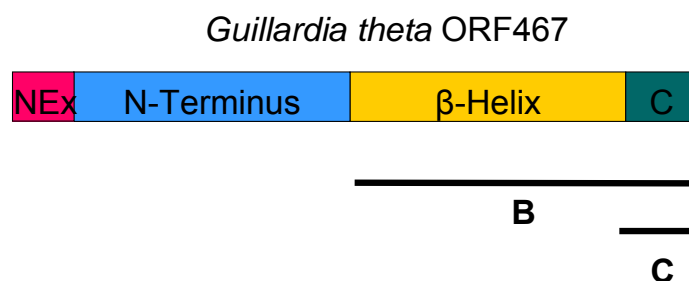


Abbildung 3.9. Konstrukte zur 2-Hybrid Interaktionsanalyse von ORF467.

Konstrukte B und C zur Interaktionsanalyse von ORF467 (*SufD*) aus *Guillardia theta*. Die Konstrukte enthalten die kodierenden Nukleotidsequenzen der durch die schwarzen Balken angedeuteten Bereiche von ORF467 NEx: N-terminale Extension von ORF467, C: C-terminale Domäne.

In der folgenden Tabelle sind die identifizierten putativen Interaktionspartner aufgelistet.

Bait		<i>Guillardia theta</i> 2-Hybrid System
B	C	BLAST-Ergebnis
	xxx	calreticulin 2 <i>Arabidopsis</i> calcium binding protein
x	xxx	Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase, chloroplast precursor
	xx	N-acetylmethionine deacetylase-like protein
	x	casein kinase 1 (<i>Chlamydomonas</i> r.)
x	xxx	cathepsin / cathepsin H
	xx	thiol methyltransferase (<i>Arabidopsis th.</i>)
xx	x	adaptor protein complex AP-1 large subunit, gamma adaptin 2 (<i>Arabidopsis th.</i>)
xx	x	6-phosphogluconolactonase (<i>Arabidopsis th.</i>), putative
x	xx	plastid-lipid associated protein PAP
	x	glutathione s-transferase related protein
	x	AhpC / TSA family protein, peroxiredoxin
	x	Response regulator containing a CheY-like receiver domain
x		H ⁺ -transporting ATPase protein - related (<i>Arabidopsis th.</i>)
x		phosphoglucomutase
	x	cyclic AMP receptor protein (<i>Haemophilus ducreyi</i>)
	x	light-harvesting protein (<i>Galdieria sulphuraria</i>)
	x	phycoerythrin alpha-3 chain, chloroplast precursor
	x	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, chloroplast precursor
	x	transcription initiation factor TFIID (TATA-sequence binding protein)
x		PP2A regulatory subunit (TAP46)

Tabelle 3.10. Hefe 2-Hybrid Interaktionsanalyse von ORF467.

Die Anzahl der identifizierten Klone ist in den Spalten B und C durch Kreuze dargestellt.

Die Interaktionsanalyse mit dem Hefe 2-Hybrid System lieferte eine Anzahl von putativen Interaktionspartnern von ORF467 aus *Guillardia theta*. Erschwert wurde die Analyse der ORF467 Interaktoren durch die sehr kurze durchschnittliche Länge der isolierbaren Interaktorsequenzen, hervorgerufen durch die kurze durchschnittliche Transkriptlänge in der als Basis dienenden cDNA Bibliothek. Dies erschwerte in vielen Fällen die exakte Identifizierung von Interaktoren, da häufig nur kurze C-terminale Aminosäuresequenzen ermittelt wurden.

3.1.8 *Guillardia theta* besitzt ein im Kern lokalisiertes Gen für SufS

Als wichtiger Bestandteil des SUF-Systems ist die putative Selenocysteinylase SufS in den meisten Organismen mit einem SUF-System anzutreffen. In *Guillardia theta* ist weder im Nucleomorph-Genom noch im Plastiden- oder Mitochondriengenom ein Gen für SufS lokalisiert. Durch die Auswertung von Sequenzdaten des in Arbeit befindlichen *Guillardia theta* EST-Projekts konnte ein *sufS*-Gen in *Guillardia theta* identifiziert werden. Die Aminosäuresequenz weist hohe Homologien zu SufS aus Pflanzen, Rotalgen und Cyanobakterien auf (siehe Abbildung 3.11).

		*	20	*	40	*	60		
gt19a11	:	-----	-----	-----	MEHHSNIVPWQLVAS	KTGAVLKHV	:	24	
slr0077	:	EIVYTRNATEAINLVAYS	WGMN--NLKAGDEIIT	TVMEHHSNLVPWQMVA	AKTGAVLK	FV	:	58	
At1g08490	:	EIVFTRNATEAINLVAYS	WGLS--NLKPGDEVILT	VAEHHSNCIVPWQIVS	OKTGAVLK	FV	:	58	
cmh014c	:	EIVFTRNATEAINTVAY	AWGLLGGNLT	PGDEIIVSVAEH	HANLVPWQLVA	ORTGARLRHI	:	60	
		*	80	*	100	*	120		
gt19a11	:	KLNSQ-QGFDMDHFRS	SILSDKTKIVAVVHVS	NMLGCINPVQ	EIVAAAHAV	GAKILLDACQ	:	83	
slr0077	:	QLDEQ-ESFDLEHFKTLL	SEKTKLVTVVHISNTL	GCVNPAEEIAQLAH	QAGAKVLVDACQ	:	117		
At1g08490	:	TLNED-EVPDINKLREL	ISPKTKLVAVHVS	NVLASSLP	IEEIVVWAHDV	GAKVLVDACQ	:	117	
cmh014c	:	PLLPQVQALDMDT	FEKMLSERTKLVA	IAYVGNVLGYVQD	VRITELAHQAGAS	VLVDACQ	:	120	
		*	140	*	160	*	180		
gt19a11	:	SAPHMPLDVRL	LDLDCDFLVASGHK	LCGPSGSGFLYGKKE	ILE-SMPPWK	GGGEMIDQVFLD	:	142	
slr0077	:	SAPHYPLDVQL	IDCDWLVS	GHKMCAPTGTG	IFLYGKEEILE-AMPP	FFGGGEMIAEVFFD	:	176	
At1g08490	:	SVPHMVVDVQ	KLNA	DFLVASSHKM	CPTGTGIFLYGKSD	LLH-SMPPF	LGGGEMISDVFLD	:	176
cmh014c	:	AVPHMPVDVQ	DIGCEWLVASGHK	MCPTGTGIGILYGKEH	VLRREMA	PFLGGGEMIAEVFLD	:	180	
		*	200	*	220	*	240		
gt19a11	:	HSTFASPPGRFE	AGTPAIAE	CYGLGAACQY	LMD-IG-MDKIESYEH	AITKHLWETLAGRE	:	200	
slr0077	:	HFTTGELPHKFE	AGTPAIAE	AIALGAAVDY	LTD-LG-MENIHNYE	VELTHVLWQGLGQIP	:	234	
At1g08490	:	HSTYAEPPSRFE	AGTPAIGE	AIALGAAVDY	LSG-IG-MPKIH	EYEV	IGKYLYEKLSSLP	:	234
cmh014c	:	HSTFADLPHKFE	AGTPSIGDA	VALGAAIDYLED	GLGGMKRIHQFEL	QLARYLYESLEQFQ	:	240	
		*	260	*	280	*	300		
gt19a11	:	DLTLYGPA	PAADG-GGRAALVAFN	HRTIQASDLIT	TELD	FE	G-VALRSGHHCTQPLHR-IL	:	257
slr0077	:	QLRLYGPN	PKHG---DRAALASFN	VAGLHASDVATM	VDDG-IAIRSGHHCTQPLHR-LF	:	289		
At1g08490	:	DVRIYGPR	PSES--VHRGALCSFN	VEGLHPTDLATFLD	QQHGVAIRSGHHCAQPLHR-YL	:	291		
cmh014c	:	EISIIYG	PPLDNDLGLBRAALCAFNV	RGVHPSDLATI	IDLDG-IAIRAGHHCAQPLHRDAL	:	299		
		*	320	*	340	*			
gt19a11	:	GVS	GSARASCYLYT	LEEEI	DEFARHLKDTIEM	FRNMDGRGGLTEVYSIKTRDC	:	310	
slr0077	:	DAS	GSARASLYFYNT	KEEIDLFLQSLQATIR	FFS--D--D-----DFTV---	:	329		
At1g08490	:	G	VNASARASLYFYNT	KDDVD	AFIVALADTVS	FEN-----SFK-----	:	328	
cmh014c	:	G	VGSARASVYVYN	SSADIDRFIDALVDAVS	VLG-----EKLTLRPA	:	341		

Abbildung 3.11. Alignment von SufS Aminosäuresequenzen.

Alignment von *Guillardia theta* SufS (gt19a11) mit SufS Sequenzen aus *Synechocystis* sp. PCC6803 (slr0077), *Arabidopsis thaliana* (At1g08490) und *Cyanidioschyzon merolae* (cmh014c).

Der isolierte EST-Klon gt19a11 aus *Guillardia theta* enthielt eine Sequenz, die im Vergleich zu SufS aus *Synechocystis*, *A. thaliana* und *C. merolae* einen verkürzten N-Terminus aufweist. Der Unterschied zu SufS aus *Synechocystis* beträgt 125 Aminosäuren, SufS aus *Arabidopsis thaliana* weist einen 169 Aminosäuren längeren N-Terminus auf.

Guillardia theta ist mit der Identifizierung von SufS im Genom des Nucleus der erste bekannte Organismus, der ein über drei verschiedene Genome verteiltes plastidäres SUF-System besitzt.

3.2 SufD in *Synechocystis* sp. PCC6803

Zur weiteren Charakterisierung der Eigenschaften und möglichen Funktionen von SufD-Proteinen wurde das cyanobakterielle SufD aus *Synechocystis* sp. PCC6803 untersucht. Dieses Cyanobakterium ermöglicht es, durch die Ausnutzung seiner natürlichen Transformationskompetenz durch Integration von externer DNA gezielte Genmutationen herzustellen. Somit können durch Genmutation und anschließende Analyse von Phänotypen Rückschlüsse auf eine mögliche Funktion des mutierten Gens erzielt werden. Vergleichbare Möglichkeiten zur effektiven Ausschaltung einzelner Gene bietet die Cryptomonade *Guillardia theta* derzeit nicht. Da SufD (Slr0076) aus *Synechocystis* sp. PCC6803 eines der nächsten cyanobakteriellen Homologen zu *Guillardia theta* ORF467 ist, erlaubt die Charakterisierung des cyanobakteriellen SufD Homologen Rückschlüsse auf die Funktion von ORF467.

3.2.1 *Synechocystis* sp. PCC6803 enthält ein *suf*-Operon

Die Gene *sufB*, *sufC*, *sufD* und *sufS* liegen in *Synechocystis* in Form eines Operons vor. Dieses *suf*-Operon ist in Cyanobakterien hoch konserviert. Die weiteren *suf*-Gene *sufA* und *sufE* sind außerhalb dieses *sufBCDS*-Operons lokalisiert (*slr1417* und *slr1419* in *Synechocystis* sp. PCC6803), während in *E.coli* und bestimmten anderen Bakterien alle *suf*-Gene von *sufA* bis *sufE* in einem Operon zusammengefasst sind.

Von Wang et al. (2004) wurde das Genprodukt von *slr0088* als transkriptioneller Repressor des *suf*-operons identifiziert und *sufR* benannt. Das *sufR*-Gen ist am 5'-Ende des *suf*-Operons lokalisiert und wird in entgegengesetzter Richtung transkribiert (Abbildung 3.12).

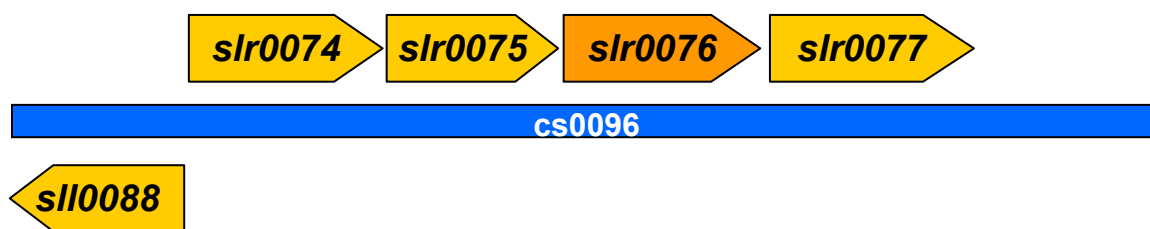


Abbildung 3.12. Das *suf*-Operon von *Synechocystis* sp. PCC6803.

Die Gene *slr0074* (*sufB*), *slr0075* (*sufC*), *slr0076* (*sufD*) und *slr0077* (*sufS*) bilden ein Operon. Das Gen *slI0088* (*sufR*) wird in entgegengesetzter Richtung transkribiert.

3.2.2 Mutation von *slr0076* in *Synechocystis* sp. PCC6803

Synechocystis sp. PCC6803 integriert exogene DNA mit hoher Effizienz durch homologe Rekombination in das Genom. Im Fall von *slr0076* (*sufD*) wurde das Wildtyp-Gen durch das Einfügen eines Gens für Kanamycin-Resistenz in die codierende Sequenz mutiert (Abbildung 3.13). Für die Klonierung des Konstrukts wurden die Primer *slr0076_a_for*, *slr0076_a_rev*, *slr0076_b_for* und *slr0076_b_rev* verwendet. Die Transformation und anschließende Isolierung von Mutanten erfolgte wie in Kapitel 2.4.2.12 beschrieben.

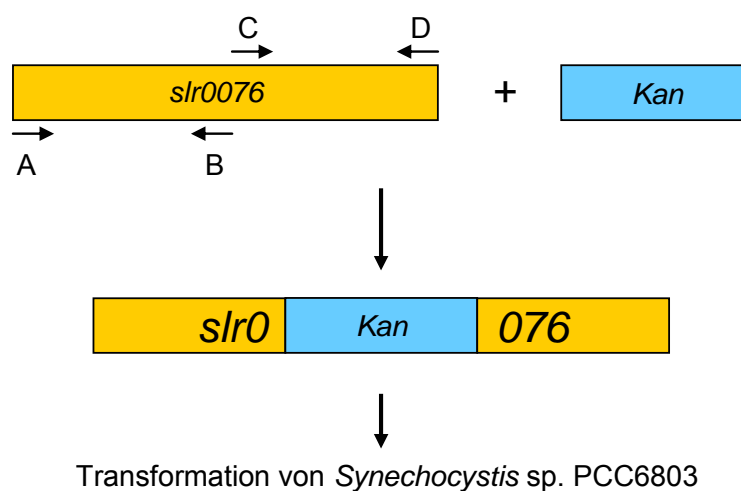


Abbildung 3.13. Schema der gezielten Mutation von *slr0076* in *Synechocystis* sp. PCC6803.

Durch Einfügen eines Gens für Kanamycin-Resistenz in die Sequenz von *slr0076* (*sufD*) wurde ein Transformationskonstrukt kloniert. Verwendete Primer sind durch Pfeile dargestellt, A: Primer *slr0076_a_for*, B: Primer *slr0076_a_rev*, C: Primer *slr0076_b_for*, D: Primer *slr0076_b_rev*.

3.2.3 Eine vollständige *slr0076* Knock-out Mutation in *Synechocystis* ist lethal

Die nach Kapitel 2.4.2.12 selektierten Transformanten wurden in Flüssigkultur mit 50 µg/ml Kanamycin kultiviert. Zur Analyse der Mutation wurde genomische DNA aus den Zellen isoliert. Die *slr0076* (*sufD*) Mutanten wurden durch eine PCR-Reaktion mit genomischer DNA und den Primern *slr0076_a_for* und *slr0076_b_rev* analysiert (Abbildung 3.14 A).

Durch die Insertion der Kanamycin-Resistenz in das *slr0076* Gen war in der Mutante ein im Vergleich zum Wildtyp um etwa 1000 Basenpaare größeres PCR-Produkt zu erwarten.

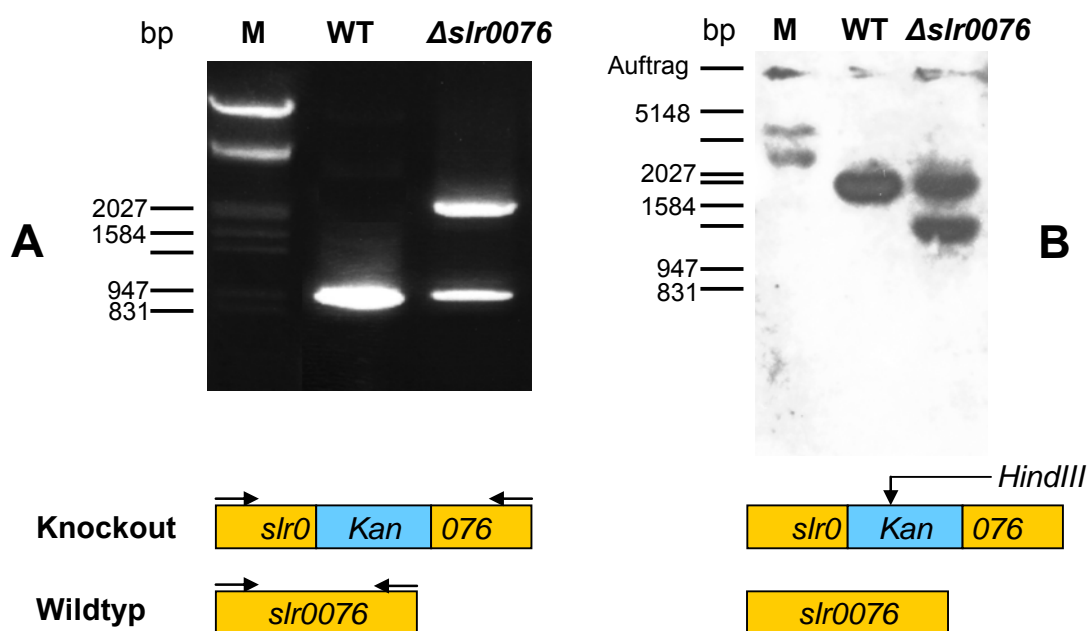


Abbildung 3.14. Analyse der Mutation von *slr0076* (*sufD*).

A: PCR-Analyse von genomischer DNA aus *Synechocystis* sp. PCC6803 Wildtyp- und $\Delta slr0076$ -Kulturen mit den für *slr0076* spezifischen Primern *slr0076a_for* und *slr0076b_rev*. Darunter: Schema der zu erwartenden PCR-Produkte.

B: Southern-Blot von genomischer DNA aus *Synechocystis* sp. PCC6803 Wildtyp- und $\Delta slr0076$ -Kulturen. Je 10 µg DNA wurde mit *HindIII* restringiert und in einem Agarosegel aufgetrennt. Die Markierung erfolgte durch Inkubation mit einer DIG-markierten spezifischen Oligonukleotidsonde für *slr0076*. M: Markerspür, WT: Wildtyp-DNA, $\Delta slr0076$: $\Delta slr0076$ -DNA. Schema: *HindIII* restringiert innerhalb des Kanamycin-Resistenzgens.

Die Analyse der PCR-Produkte zeigte, dass eine Mutation von *slr0076* nur in einem Teil der in der Zelle vorliegenden Kopien des Genoms erfolgt war. Deutlich war das Vorliegen des Wildtypgens *slr0076* ohne Insertion der Kanamycin-Resistenz in den $\Delta slr0076$ Zellen nachzuweisen.

Auch durch Versuche, durch stringenter Selektion auf Medium mit Kanamycin-Konzentrationen bis 100 µg/ml und zusätzliche erneute Transformationsversuche konnte keine vollständige Eliminierung des Wildtyp-Gens erreicht werden. Es musste davon ausgegangen werden, dass ein *slr0076* (*sufD*) Knockout für *Synechocystis* sp. PCC6803 in allen 10 Genomkopien, die in *Synechocystis* sp. PCC6803 pro Zelle vorliegen, lethal ist.

Durch einen Southern-Blot mit genomischer DNA der *Aslr0076* Mutante von *Synechocystis* und einer für *slr0076* spezifischen DIG-markierten Oligonukleotidsonde wurde das Ergebnis der PCR-Analyse bestätigt (Abbildung 3.14 B).

Genomische DNA von *Aslr0076*- und Wildtyp-Zellen wurde isoliert und durch Restriktion mit der Restriktionsendonuklease *Hind*III fragmentiert. Der Southern-Blot wurde mit einer für *slr0076* spezifischen Sonde inkubiert. Der Auswertung des Southern-Blots zeigte deutlich zwei Banden in der Spur der *Aslr0076* DNA. Zusätzlich zur Wildtyp-Bande (obere Bande Spur *Aslr0076*) war die Bande des *Aslr0076* Knockouts als Bande geringerer Größe, verursacht durch die Restriktion mit *Hind*III innerhalb der Kanamycin-Resistenz, in annähernd gleicher Intensität markiert.

Somit war das Vorliegen einer heterogenomischen *Aslr0076* Mutante eindeutig nachgewiesen.

3.2.4 *Aslr0076* Zellen von *Synechocystis* sp. PCC6803 zeigen einen spezifischen Phänotyp

Die Kulturen der heterogenomischen Knockout-Mutante zeigten im Vergleich zur Wildtyp-Linie bei lichtmikroskopischer Betrachtung zunächst keine sichtbaren Unterschiede. Die Umstellung der Kultivierung von photoautotrophen auf mixotrophe Bedingungen durch Zusatz von 10 mM Glukose zum Kulturmedium, zunächst mit dem Ziel, die Überlebensfähigkeit einer homogenomische Mutante zu erhöhen, zeigte bereits nach wenigen Tagen Kultivierung einen spezifischen Phänotyp der *Aslr0076* (*sufD*) Knockout-Mutante.

Bei lichtmikroskopischer Betrachtung der *Synechocystis* Knockout-Kultur war zu beobachten, dass die Zellen der *Aslr0076* Mutante charakteristische aus zwei Zellen bestehende Teilungsstadien bildeten. Gelegentlich waren auch Teilungsstadien aus drei und selten aus vier Zellen zu beobachten (Abbildung 3.15).

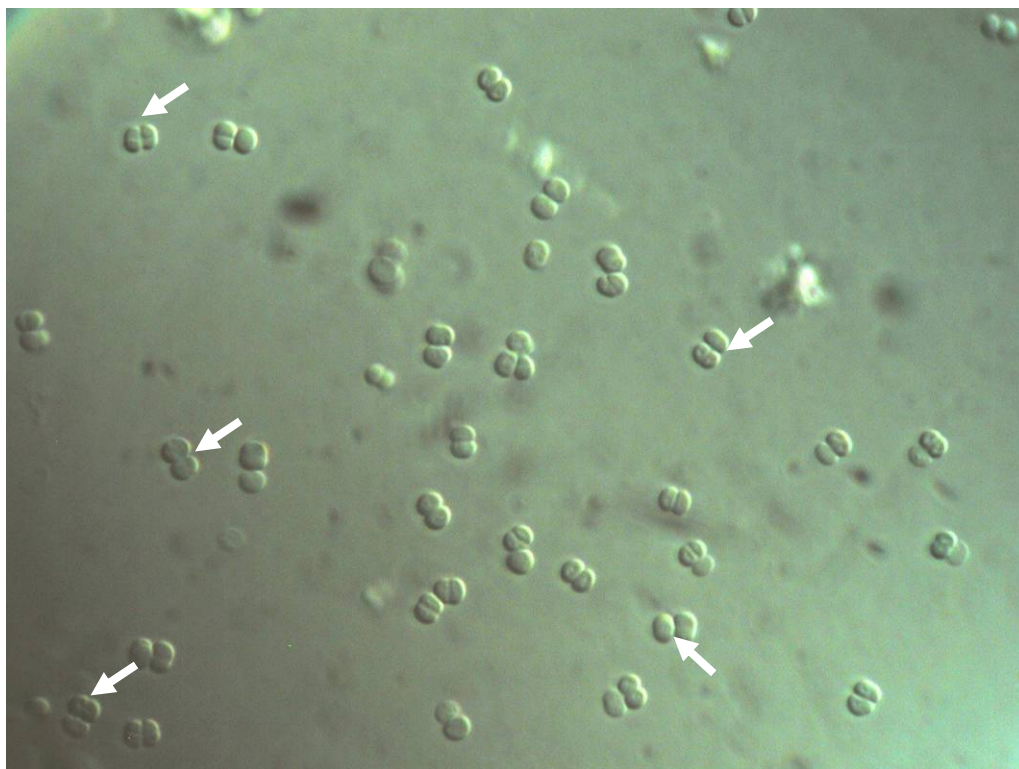


Abbildung 3.15. Phänotyp von *Aslr0076* Zellen von *Synechocystis* sp. PCC6803.

Die weißen Pfeile markieren aus jeweils 2 Zellen bestehende Teilungsstadien. Kultivierung erfolgte in BG-11 Kulturmedium mit 50 µg/ml Kanamycin und 10 mM Glukose. Lichtmikroskopische Aufnahme in 100-facher Vergrößerung.

Genaueren Aufschluß über die Art der Verbindung der Zellen untereinander, ob durch Adhäsion oder direkte Verbindung mit Membranen, konnte eine elektronenmikroskopische Untersuchung der *Synechocystis* Zellen geben.

Bei der Kultivierung der *Aslr0076* Mutante war nach 10-14 Tagen eine nicht quantifizierte gelblich-braune klare Verfärbung des Kulturmediums zu beobachten, die Ursache dieser Verfärbung blieb unklar.

3.2.5 Elektronenmikroskopische Untersuchung von *Aslr0076* Zellen

Zellen von *Synechocystis* sp. PCC6803 *Aslr0076* Kultur und Wildtyp-Kultur wurden mit Osmiumoxid fixiert und in Epon-Gießharz eingebettet. Ultradünnschnitte wurden angefertigt und elektronenmikroskopisch untersucht.

Die Knockout-Kultur zeigte ein ungewöhnliches Teilungsbild (Abbildung 3.16 a, c, d). Die zwei sich teilenden Zellen sind noch über die äußere Membran miteinander verbunden (siehe Pfeile), während die Abschnürung der inneren Membran vollständig abgeschlossen ist. Beide Zellen beginnen jedoch bereits mit dem nächsten Zellteilungszyklus, die Abschnürung der inneren Membran ist deutlich zu erkennen. Der Raum zwischen äußerer und innerer Membran ist mit elektronendichtem Material (im elektronenmikroskopischen Bild schwarz) gefüllt.

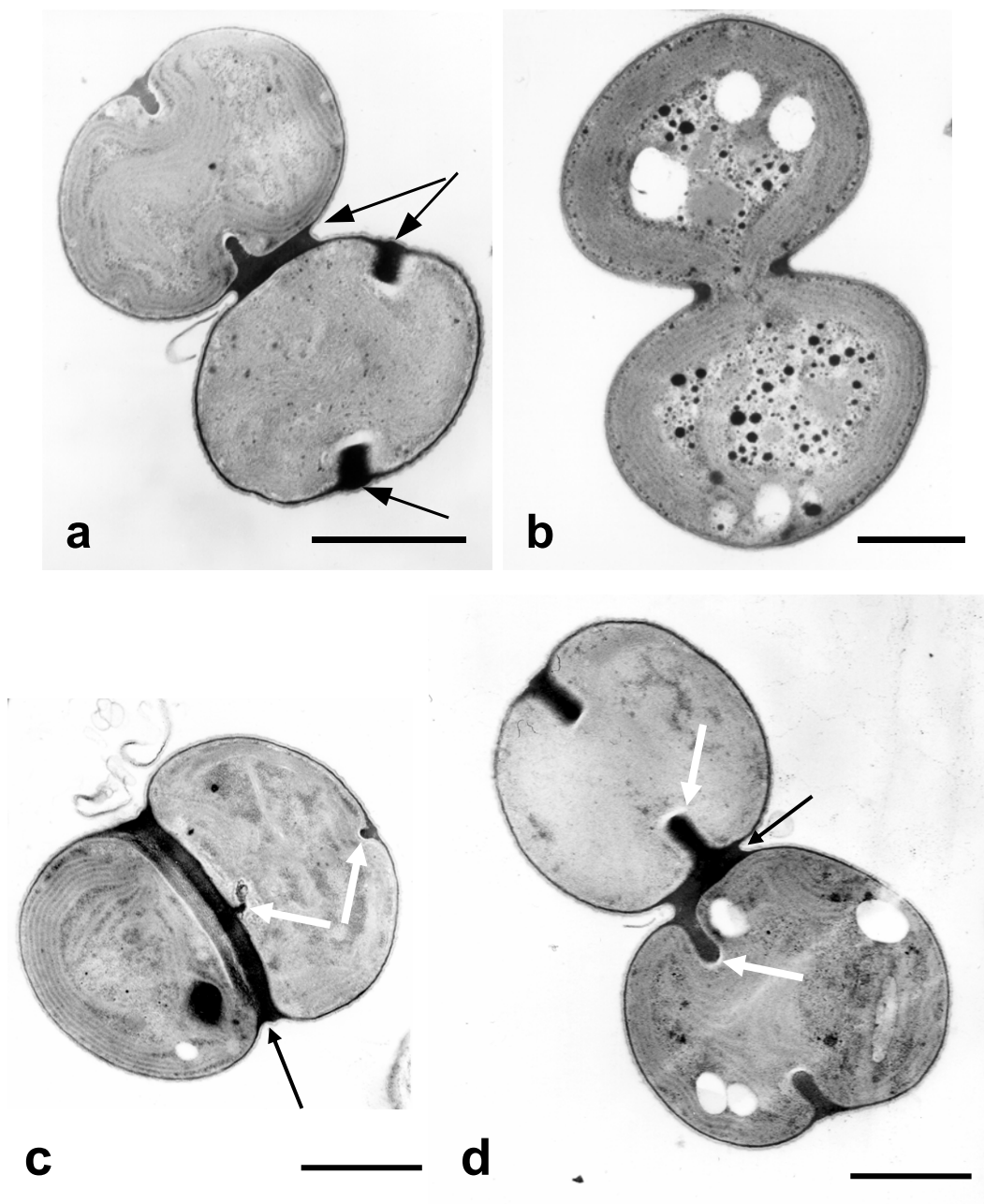


Abbildung 3.16. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *Synechocystis* sp. PCC6803 *Aslr0076* Zellen.

a, c, d: *Aslr0076* Zellen in Teilung. Schwarze Pfeile markieren Septationsstellen. Weiße Pfeile in **c**) und **d**) zeigen Einschnürung der inneren Membran im darauffolgenden Teilungszyklus. **b:** Wildtyp-Zellen. Maßstab 1 μm

Im Vergleich zu dem üblichen Teilungsvorgang im Wildtyp (Abbildung 3.16 b) ist keine gleichmäßige korrespondierende Einschnürung von äußerer und innerer Membran zu beobachten. Desweiteren ist keine regelmäßige räumliche Anordnung der Septationsstelle des zweiten Teilungszyklus in Bezug zur primären Einschnürungsstelle zu beobachten.

3.2.6 UV-VIS Absorptionsspektren von *Aslr0076* Zellen

Zur eventuellen Identifizierung von Unterschieden in der Pigment-Zusammensetzung des Photosynthese-Apparats von *Aslr0076* Zellen wurde ein UV-VIS Spektrum der Flüssigkultur gemessen und mit dem Spektrum einer Wildtyp-Kultur verglichen. Die geringfügig weniger intensive grüne Färbung der Mutanten-Kulturen im Vergleich zu Wildtyp-Kulturen ließ auf einen verringerten Gehalt an Chlorophyllen schließen und sollte durch eine spektroskopische Untersuchung verifiziert werden.

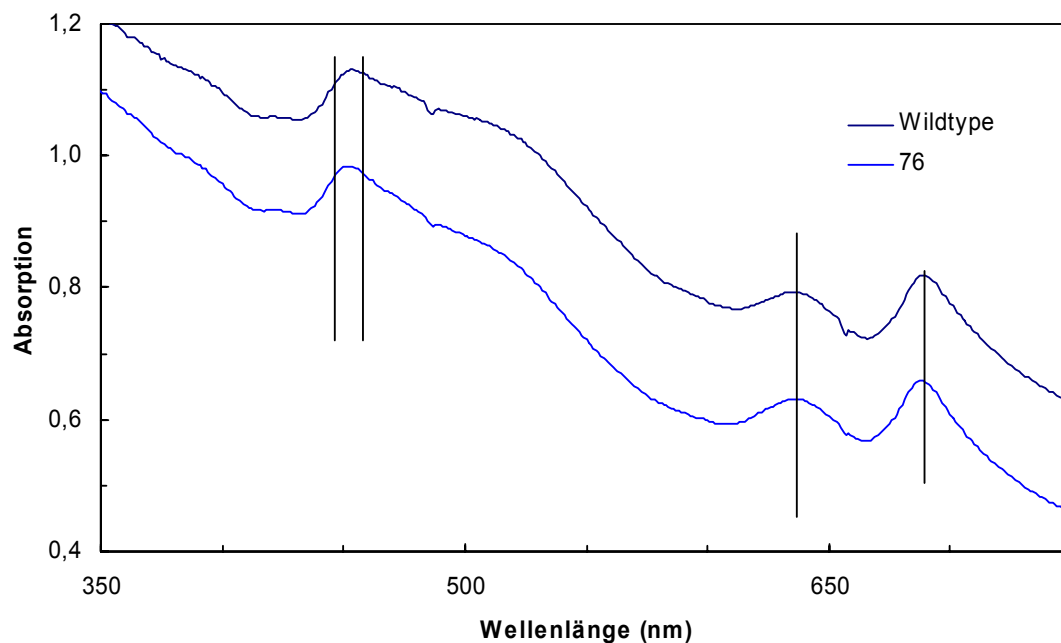


Abbildung 3.17. UV-VIS Absorptionsspektrum von *Aslr0076* und Wildtyp Zellen.

Die Spektren von Wildtyp und *Aslr0076* Mutante wurden nach der Messung auf der y-Achse gegeneinander verschoben, um einen besseren Vergleich zu ermöglichen. Senkrechte Hilfslinien zum Vergleich der Absorptions-Peaks sind eingezeichnet.

Die UV-VIS Absorptionsspektren der *Synechocystis Aslr0076* und Wildtyp-Kulturen wurden im Wellenlängenbereich von 350 nm bis 750 nm aufgenommen. Das Primärspektrum der Mutante (Abbildung 3.17) zeigt keine signifikanten Abweichungen in der Lage der Absorptionsmaxima- und Minima im Vergleich zum Spektrum der Wildtyp-Kultur.

Die zweite Ableitung des UV-VIS Spektrums (Abbildung 3.18) ließ ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der Lage und Intensität der Absorptionspeaks hervortreten. Die Absorptionseigenschaften der Wildtyp- und Mutantenkultur unterscheiden sich im Wesentlichen nicht. Lediglich die Absorptionswerte im Bereich der Phycobiliproteinen bei etwa 640 nm unterschieden sich geringfügig. Jedoch war durch die gemessenen geringen Unterschiede nicht auf einen Defekt oder ein Fehlen von Chlorophyll oder Phycobiliproteinen zu schließen.

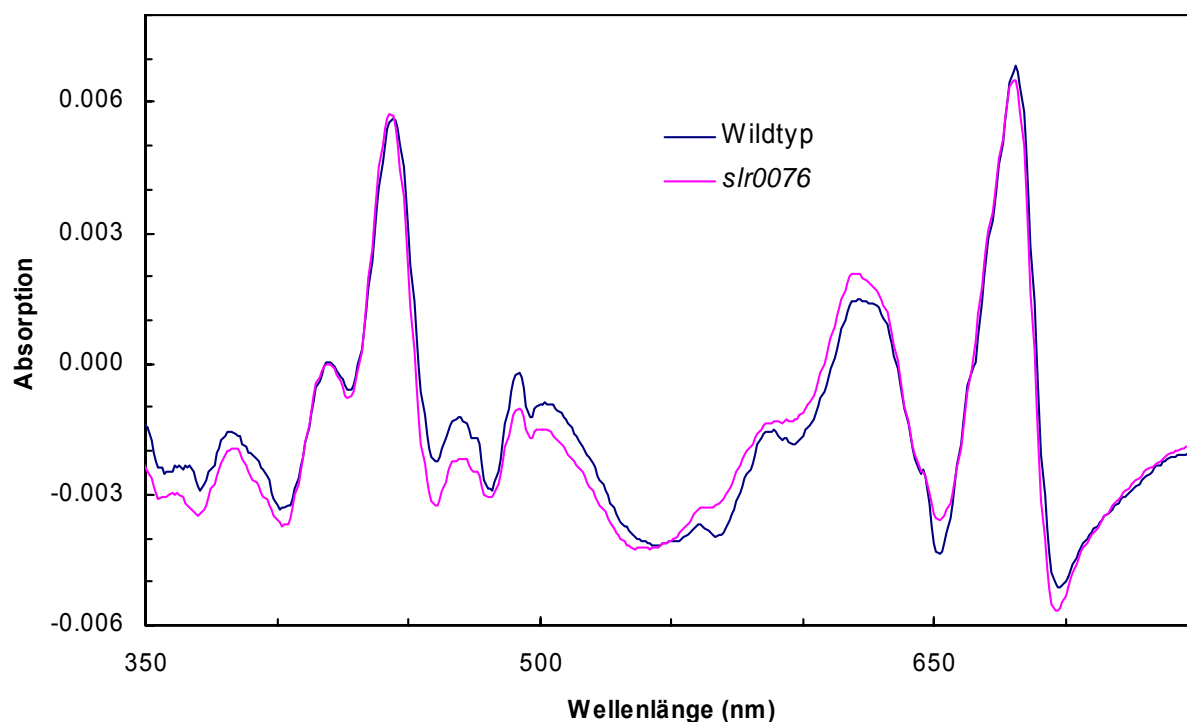


Abbildung 3.18. UV-VIS Ableitungsspektrum *Aslr0076* und Wildtyp Zellen.

Zweite Ableitung der Absorption von *Aslr0076* Mutante und Wildtyp, gemessen in einer Zellsuspension im Bereich von 350-750 nm.

3.2.7 *Synechocystis* *Aslr0076* Zellen zeigen eine erhöhte Eisenaufnahme

Aus Untersuchungen von Nachin et al. (2001) ist bekannt, dass in Mutanten des *suf*-Operons von *Erwinia chrysanthemi* ein erhöhter Eisenspiegel nachweisbar ist. Die Regulation des *suf*-Operons erfolgt unter anderem durch den Fur-Repressor (Ferric uptake repressor). Dieses DNA-bindende Protein kontrolliert in zahlreichen Bakterien ebenfalls die Expression von Genen, die für die Eisenaufnahme notwendig sind (Hantke, 1981; Tolmasky et al., 1994; Xiong et al., 2000). Um eine Bedeutung von SufD für die Aufnahme von Eisen in *Synechocystis*-Zellen zu klären, wurde ein Importexperiment mit radioaktivem ^{55}Fe durchgeführt.

Die Durchführung des Eisenimports erfolgte nach Kapitel 2.4.6. Zellen von *Aslr0076* und Wildtyp wurden in eisenfreiem Medium kultiviert und anschließend mit radioaktivem $^{55}\text{FeCl}_3$ versetzt. Die Quantifizierung der aufgenommenen Menge radioaktiven Eisens erfolgte durch Messung mit einem Szintillationszähler.

Die Auswertung der Messungen zeigte eine erhöhte Aufnahme von radioaktivem Eisen in den verwendeten *Aslr0076* Kulturen (Abbildung 3.19).

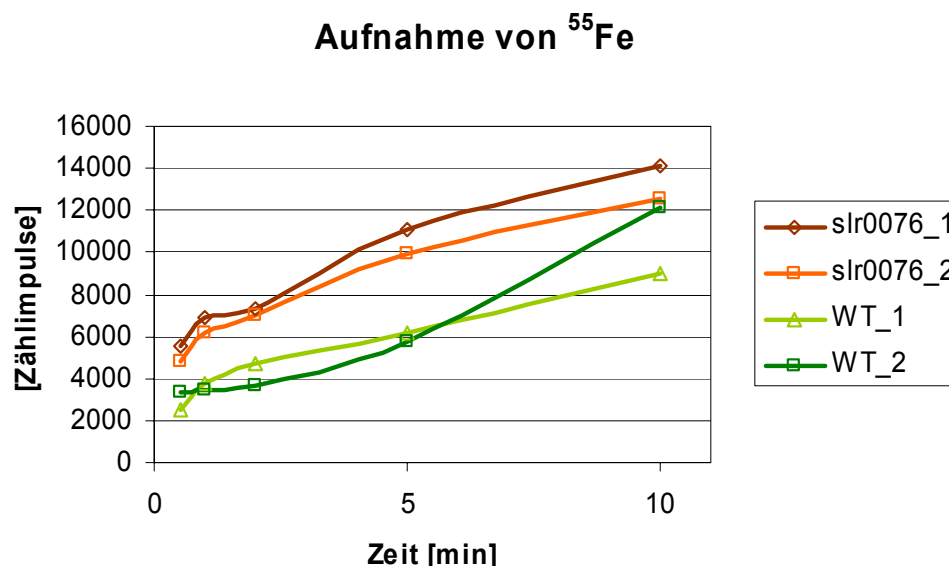


Abbildung 3.19. Eisenimport in *Synechocystis* *Aslr0076* und Wildtyp Zellen.

Eine gleiche Anzahl von Zellen aus jeweils zwei parallel kultivierte Flüssigkulturen von Wildtyp und *Aslr0076* Mutante wurden mit radioaktivem $^{55}\text{FeCl}_3$ versetzt, die Reaktion nach der auf der x-Achse angegebenen Zeit gestoppt und die inkorporierte Radioaktivität im Szintillationszähler gemessen.

3.3 SufD in *Arabidopsis thaliana*

Im Genom von *Arabidopsis thaliana* finden sich Homologe für *sufA* bis *sufE* (siehe auch Tabelle 4.1). Alle diese Gene codieren für Proteine mit einem vorhergesagten plastidären Transitpeptid. Auch das zu ORF467 (SufD) homologe Protein At1g32500 (ATNAP6) besitzt ein solches Transitpeptid von 36 Aminosäuren Länge (Tabelle 3.20).

Name	Length	cTP	mTP	SP	other	Loc.	RC	TPlen
SufD	475	0.897	0.168	0.008	0.025	C	2	36

Tabelle 3.20. Vorhersage der plastidären Transitpeptid-Sequenz.

Die Analyse wurde mit TargetP ([www.cbs.dtu.dk /services/TargetP/](http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/)) durchgeführt. cTP: chloroplast Transit Peptide, mTP: mitochondrial Targeting Peptide, SP: Secretory Pathway, Loc.: Localization, RC: Reliability Class. TPlen: Transitpeptide Länge. Hohe Werte (<1) für die Lokalisierung zeigt höhere Wahrscheinlichkeit an. Niedrige Werte (von 1 bis 5) für RC zeigen höhere Genauigkeit an.

Die bereits in Kapitel 3.1.4 beschriebenen durchgeführten Analysen zur Protein-Sekundärstruktur von ORF467 ergaben eine hohe Übereinstimmung mit den ermittelten Daten aus den entsprechenden Analysen des *Arabidopsis* SufD-Homologen At1g32500. Auch für At1g32500 (ATNAP6) wurde eine β -Faltblattstruktur vorhergesagt, gefolgt von drei α -Helices am äußeren C-Terminus des Proteins (Abbildung 3.21). Die Topologie des Proteins zeigte somit weitgehende Ähnlichkeit zum *Guillardia theta* SufD Protein.

MAAATVLGRLSLIPNLSSKPKLKSNNRRTTSTSVSVRAQASFSDFVLQLAESLEDLSASPSSSLPLQRI RDSSAETL
LSTPWPSRKDEPFRFTDTSLIRSSQIEPISTQQRNSEILDNLTTETQFTNAVIDGFVSNLTIGPSDLPDGVYFGKYSG
LPDELTNRIFEFIGNFDSGDLFWSINGMGAPDLMVIYVPEGCKVENPIYLRYSGETGDRESKRLPVSNNPRVFVLVEE
GGEIGIVEEFVGKDEEGFYWTNPVLEV VVQKNAKLKHSYLQKESMASAHIKWTFVRQEA ESEYELVEVSTGGKLGRHN
VHVQQLGPDTLTELTTFHMCVNEQTLDLHSKIILDHPRGASRQLHKCIVAHSSGQAVFDGNVRVNRFAQQTNAGQLTR
SLLLKPRATVNIKPNLQIIADDVKCSHGAAISDLEEDQLFYFQARGIDLETARRALISSFGSEVIEKFPNREIRDQAR
NHVKGLL

Abbildung 3.21. Proteindomänen von *Arabidopsis thaliana* ATNAP6 (At1g32500).

Aminosäuresequenz von ATNAP6 (At1g32500) mit gekennzeichneten Domänen. Magenta: Transitpeptid, Gelb: β -Helix Domäne, Blaugrün: Dreifache α -Helix Domäne am C-Terminus. Vorhersage der Sekundärstruktur durch JPRED.

3.3.1 In vivo Lokalisation eines ATNAP6-GFP Fusionsproteins

Zur Analyse der *in vivo* Lokalisation von ATNAP6 wurde die vollständige kodierende Sequenz von ATNAP6 als Fusion an den N-Terminus von GFP kloniert. Durch diese Art der Fusion war zum einen das vorhandene putative plastidäre Transitpeptid frei zugänglich und zum anderen war eine Kontrolle der korrekten Expression des kompletten Fusionsproteins möglich. Mögliche Probleme wie sie bei der N-terminalen Positionierung von GFP im Konstrukt durch die Expression von partiellen Fusionsproteinen auftreten können, wurden so verhindert.

Der Transformationsvektor pAVA393 (von Arnim et al., 1998) wurde in Protoplasten aus *Arabidopsis thaliana* Blattgewebe transfiziert (Kapitel 2.4.4.3). Die Expression des GFP-Fusionsproteins wurde mit einem konfokalen Laserscanning Mikroskop (KLSM) durch Anregung mit blauem Licht anhand der Emission von grünem Licht detektiert.

3.3.2 Ein *Arabidopsis* ATNAP6-GFP Fusionsprotein ist plastidenlokalisiert

Die kodierende Sequenz für das vollständige ATNAP6-Protein wurde vor die GFP-Sequenz fusioniert. Nach Transfektion in Protoplasten aus *Arabidopsis* wurde die mikroskopische Analyse mit dem konfokalen Laserscanning Mikroskop durchgeführt. Die Aufnahme der Abbildungen erfolgte getrennt für den grünen und roten Bereich des Spektrums, für die GFP-Fluoreszenz und zur Detektion der Autofluoreszenz der Chloroplasten. Durch Überlagerung der Daten aus beiden Aufnahmekanälen konnte die genaue Lokalisierung bestimmt werden.

Das überexprimierte ATNAP6-GFP Fusionsproteins zeigte eine plastidäre Lokalisation (Abbildung 3.22). Die detektierte GFP-Fluoreszenz war nicht gleichmäßig über das Stroma der Chloroplasten verteilt, sondern zeigte eine punktuelle Verteilung. In Abbildung 3.23 ist eine vergrößerte Aufnahme eines einzelnen Chloroplasten dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Fluoreszenz des GFP in Bereichen des Chloroplasten detektiert wird, in denen keine Autofluoreszenz des Chlorophylls auftritt.

Diese Domänen der GFP-Fluoreszenz lagen in den durchgeführten Experimenten immer am Rand der Chloroplasten und waren in keinem Experiment als mittige Einbettungen der GFP-Domäne im Chloroplasten zu beobachten.

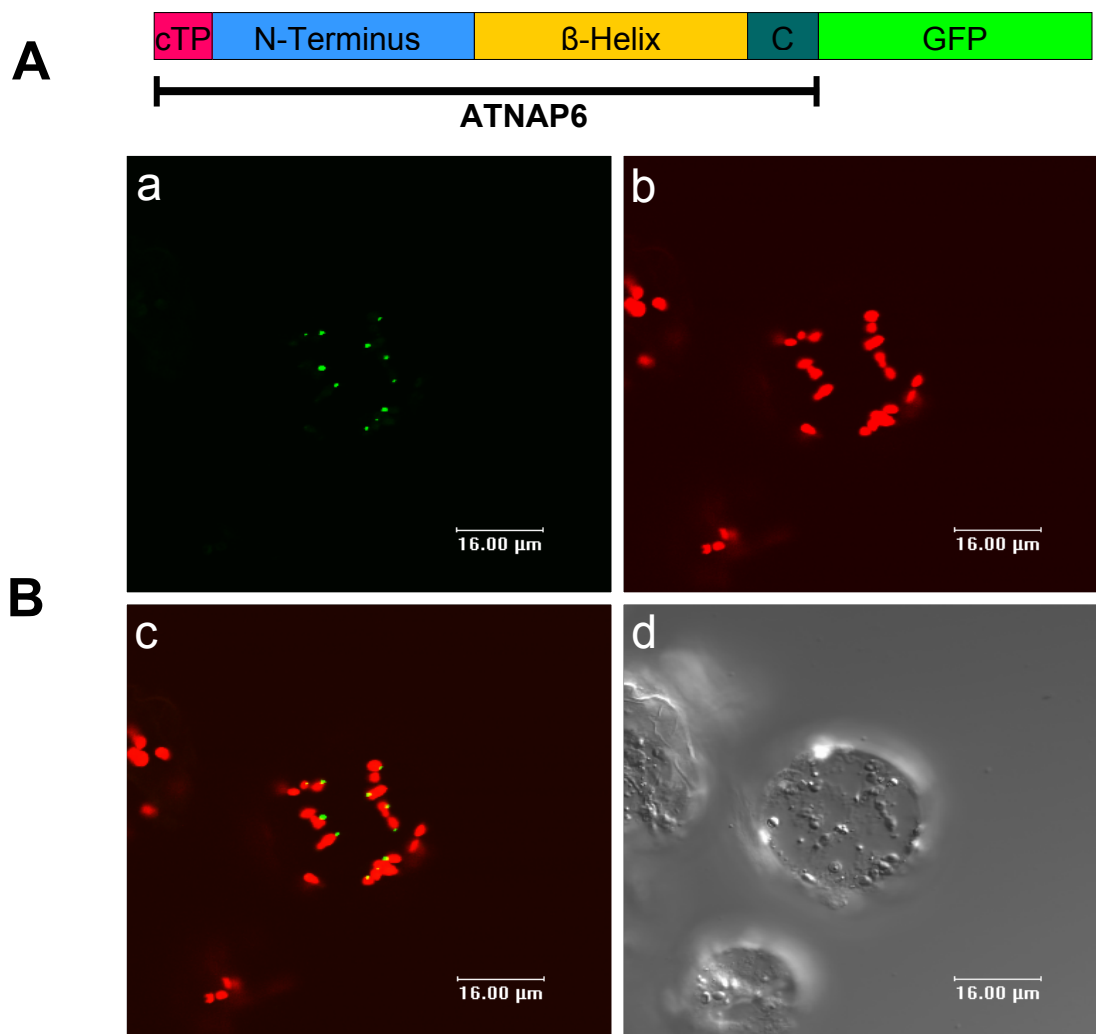


Abbildung 3.22. Plastidäre Lokalisation von ATNAP6-GFP Fusionsprotein in *Arabidopsis thaliana* Protoplasten.

A: Der Aufbau des Fusionsproteins ist schematisch dargestellt. **B:** Aufnahmen des konfokalen Laserscanning Mikroskops. **a:** GFP-Fluoreszenz, **b:** Autofluoreszenz der Chloroplasten, **c:** Überlagerung von **a** und **b**, **d:** Phaseninterferenzkontrast Aufnahme des untersuchten Protoplasten.

Pro Chloroplast war nur eine Fluoreszenz-Domäne zu identifizieren, durch nahe beinander liegende Plastiden war in einigen Zellen eine Zuordnung der Fluoreszenz-Domänen zu einzelnen Chloroplasten nur durch Analyse von mehreren Aufnahmen entlang der z-Raumachse möglich. Die subplastidäre Lokalisation des ATNAP6-GFP Fusionsproteins in klar abgegrenzten Bereichen („Spots“) erinnerte an die für *Guillardia theta* ORF467 beobachtete Signalverteilung bei der Immunogold-Detektierung (Abbildung 3.4).

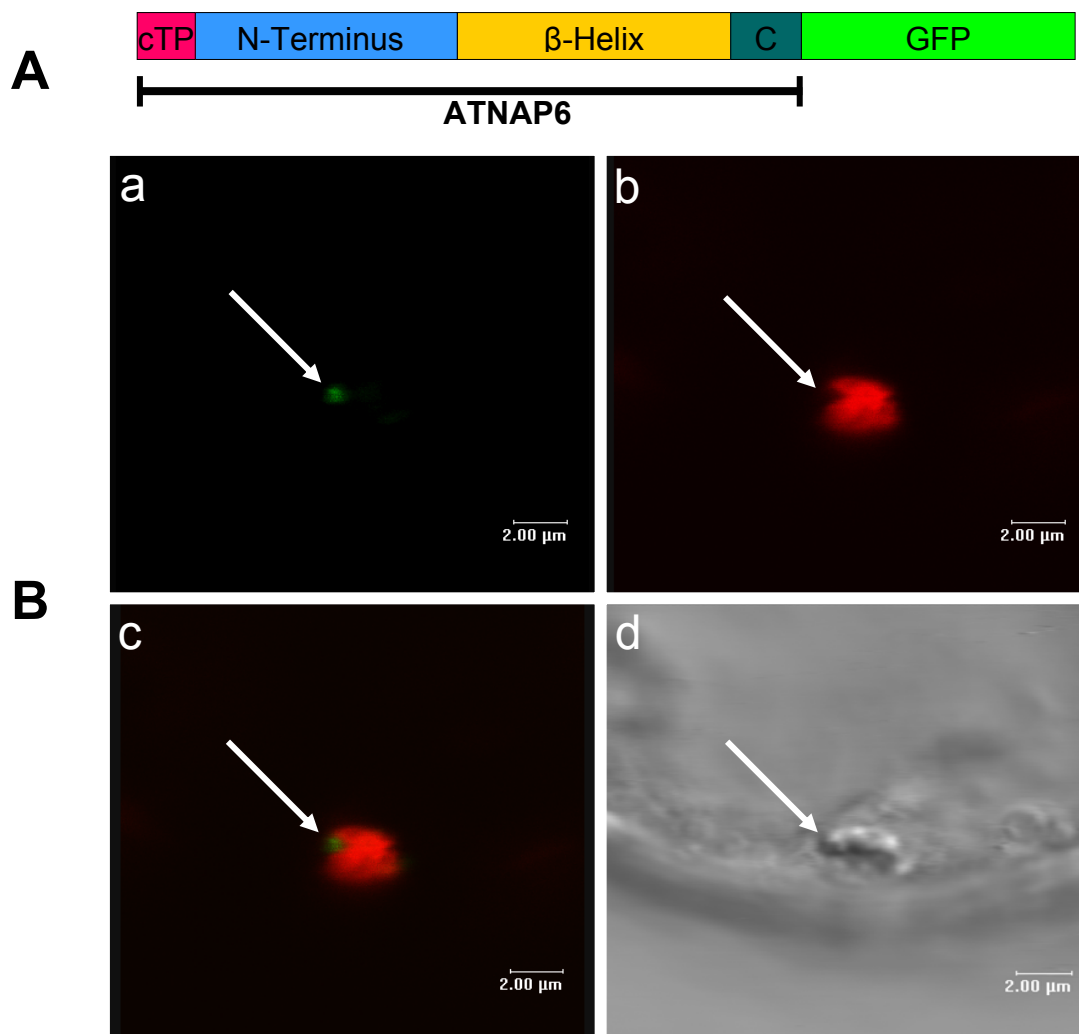


Abbildung 3.23. Plastidäre Lokalisation von ATNAP6-GFP Fusionsprotein.

Vergrößerung eines Chloroplasten. **A:** Aufbau des Fusionsproteins. **B:** Aufnahmen des konfokalen Lasescanning Mikroskops. **a:** GFP-Fluoreszenz, **b:** Autofluoreszenz, **c:** Überlagerung von **a** und **b**, **d:** Phaseninterferenzkontrast-aufnahme. Weiße Pfeile zeigen Stelle der GFP-Fluoreszenz.

In weiteren Analysen wurden die für diese Lokalisierung verantwortlichen Domänen des Proteins ermittelt. Ziel war hierbei, einen Einfluß der ungewöhnlichen Sekundärstruktur von ATNAP6 (SufD), insbesondere der β -helikalen Domäne, auf die beobachtete subplastidäre Lokalisation zu ermitteln.

Durch gezielte Deletion einzelner Domänen von *Arabidopsis* ATNAP6 (SufD) konnte die Bedeutung der einzelnen Bereiche des Proteins für die beobachtete Lokalisierung ermittelt werden. Das Hauptaugenmerk lag hierbei auf dem Vergleich der Lokalisierungen von GFP-Fusionsproteinen mit der β -helikalen Domäne von ATNAP6 (SufD) und Fusionsproteinen, die

diese Domäne nicht enthielten. Zusätzlich wurden weitere Konstrukte angefertigt, um einen Einfluß der übrigen Proteindomänen von ATNAP6 (SufD) zu überprüfen.

3.3.3 Die β -Helix Domäne von ATNAP6 aus *Arabidopsis thaliana* verursacht eine subplastidäre Lokalisation

Durch die Deletion des gesamten β -helikalen Bereichs aus ATNAP6 wurde ein modifiziertes ATNAP6-GFP Konstrukt kloniert und das Fusionsprotein in Protoplasten exprimiert (Abbildung 3.24).

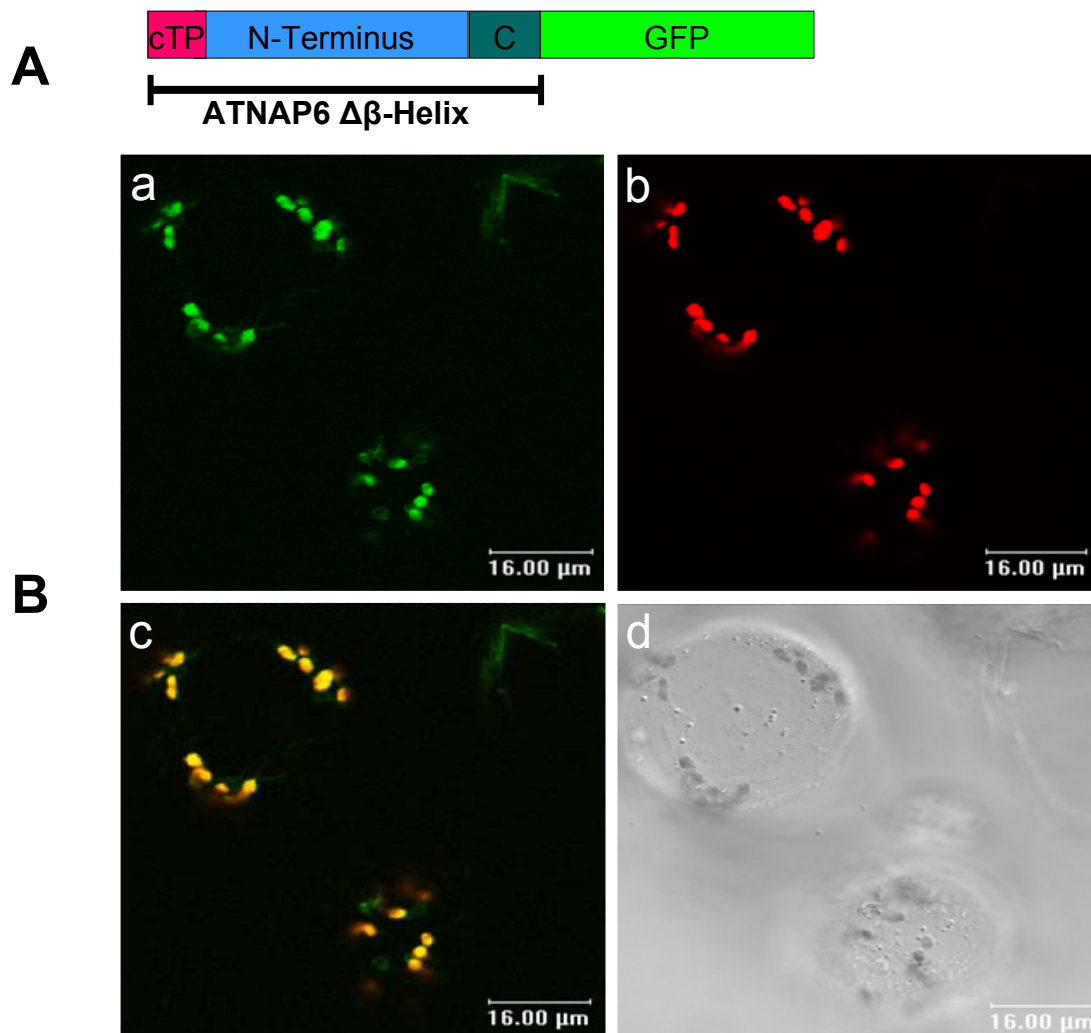


Abbildung 3.24. Plastidäre Lokalisation von ATNAP6 $\Delta\beta$ -Helix -GFP Fusionsprotein.

Die Abbildung zeigt zwei transformierte Protoplasten. **A:** Aufbau des Fusionsproteins. **B:** Aufnahmen des KLSM. **a:** GFP-Fluoreszenz, **b:** Autofluoreszenz, **c:** Überlagerung von **a** und **b**, **d:** Phaseninterferenzkontrast-Aufnahme.

In der Abbildung 3.24 ist deutlich zu erkennen, dass ein Fusionsprotein aus ATNAP6 und GFP, in dem die β -helikale Domäne von ATNAP6 gezielt deletiert worden war, im Stroma der Chloroplasten lokalisiert war. Die zuvor beobachtete subplastidäre Lokalisation (vergleiche Abbildung 3.22 und 3.23) trat nicht mehr auf. ATNAP6 ohne β -helikale Domäne zeigte das klassische Lokalisierungsbild eines löslichen, plastidär lokalisierten Proteins.

Weitere Modifikationen von ATNAP6 wurden als Fusionsproteine mit GFP exprimiert. In der Abbildung 3.25 sind die weiteren durchgeführten Lokalisationsexperimente zusammengefasst.

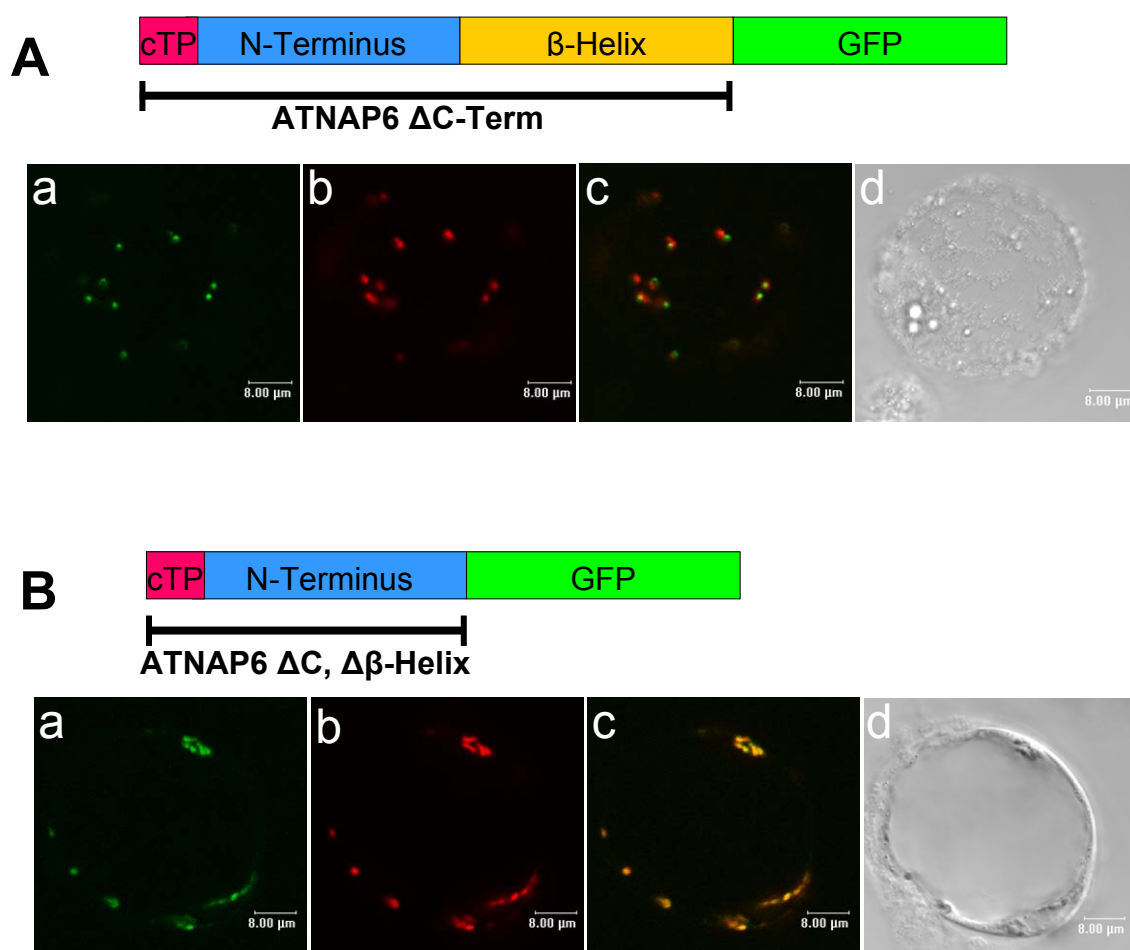


Abbildung 3.25 A und B. Plastidäre Lokalisierung von ATNAP6 Δ C-Term und ATNAP6 Δ C-Term, $\Delta\beta$ -Helix GFP Fusionsproteinen.

A: Deletion des C-Terminus von ATNAP6. **B:** Deletion von β -Helix und C-Terminus. KLSM-Aufnahmen: **a:** GFP-Fluoreszenz, **b:** Autofluoreszenz, **c:** Überlagerung von **a** und **b**, **d:** Phaseninterferenzkontrast-Aufnahme. Maßstab 8 μ m.

Es wurde ein Konstrukt kloniert, bei dem die C-terminale Domäne deletiert wurde, eines mit einer Deletion von β -helikaler und C-terminaler Domäne, sowie ein nur aus dem Transitpeptid von Cpn60 bestehendes Konstrukt. Dabei bestätigte sich in allen Fällen, dass die β -helikale Domäne für die Lokalisierung von ATNAP6 in subplastidären Bereichen notwendig ist.

Die Deletion des C-Terminus beeinflusste die subplastidäre Lokalisation des ATNAP6-GFP Fusionsproteins nicht (Abbildung 3.25 A). Bei Deletion der β -helikalen Domäne und der C-terminalen Domäne von ATNAP6 war keine Lokalisierung des ATNAP6-GFP Fusionsproteins in subplastidären Domänen zu beobachten. Die GFP-Fluoreszenz erschien gleichmäßig über das Stroma der Plastiden verteilt (Abbildung 3.25 B).

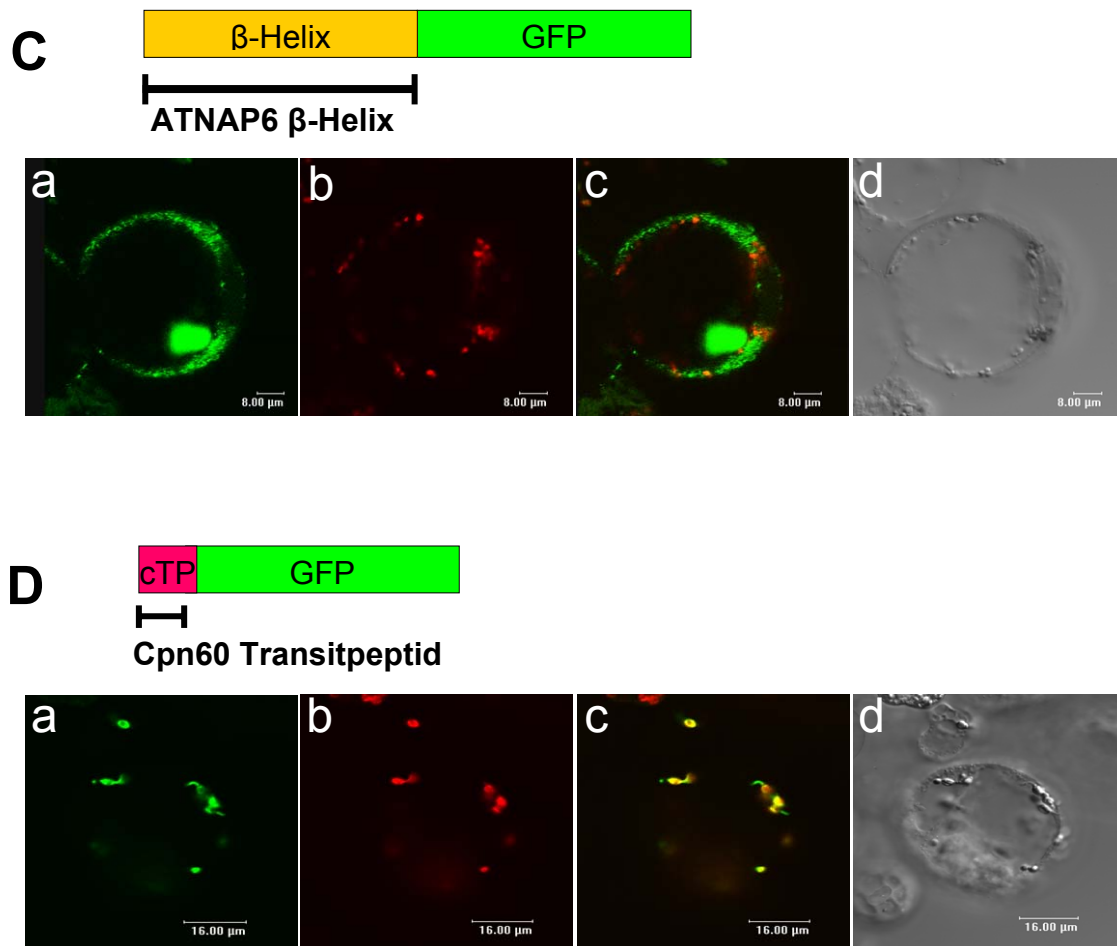


Abbildung 3.25 C und D. Plastidäre Lokalisierung von modifizierten ATNAP6-GFP Fusionsproteinen.

C: Cytosolische Expression der β -Helix Domäne von ATNAP6 ohne Transitpeptid. **D:** Kontrollexperiment mit plastidärem Transitpeptid von Cpn60 aus *Arabidopsis thaliana*. KLSM-Aufnahmen: **a:** GFP-Fluoreszenz, **b:** Autofluoreszenz, **c:** Überlagerung von **a** und **b**, **d:** Phaseninterferenzkontrast-Aufnahme. Maßstab **C** 8 μ m, **D** 16 μ m.

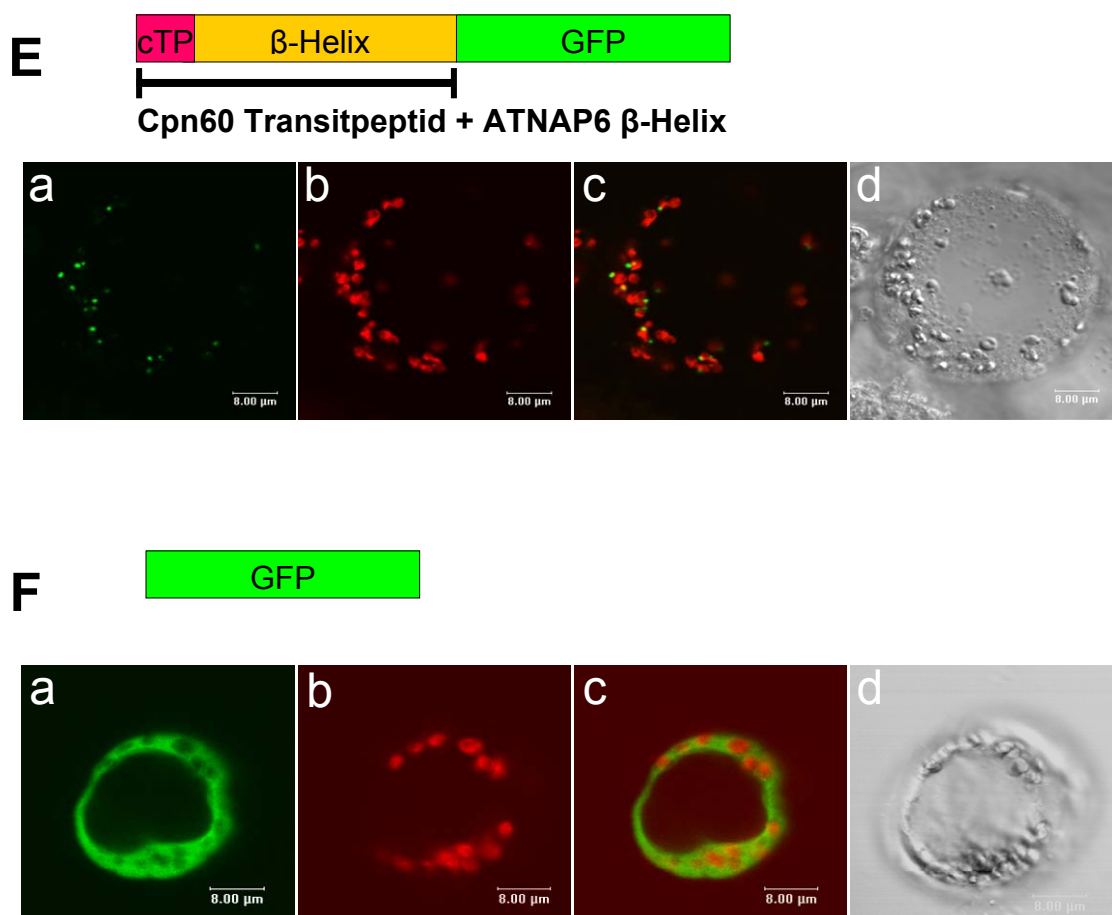


Abbildung 3.25 E und F. Plastidäre Lokalisierung von modifizierten ATNAP6-GFP Fusionsproteinen.

E: Fusionsprotein aus der β -Helix Domäne und dem Cpn60 Transitpeptid. **F:** Kontrollexperiment zur Expression von GFP in Protoplasten von *Arabidopsis thaliana*. KLSM-Aufnahmen: **a:** GFP-Fluoreszenz, **b:** Autofluoreszenz, **c:** Überlagerung von **a** und **b**, **d:** Phaseninterferenzkontrast-Aufnahme. Maßstab 8 μ m.

Bei der Expression der β -Helix Domäne von ATNAP6 im Cytosol der Protoplasten (Abbildung 3.25 C) war eine über das Cytosol verteilte GFP-Fluoreszenz zu beobachten, diese erschien ungleichmäßig (vergleiche Abbildung 3.25 G für GFP im Cytosol) und deutete eine teilweise Aggregation des Fusionsproteins im Cytosol an.

Ein GFP-Fusionsprotein aus dem Transitpeptid des plastidären Chaperons Cpn60 und der β -Helix von ATNAP6 unterschied sich in der Lokalisierung nicht von dem vollständigen ATNAP6-GFP Fusionsprotein (Abbildung 3.25 E) und zeigte, dass das Transitpeptid von ATNAP6 ein funktionsfähiges topogenes Signal ist.

3.3.4 ORF467 (SufD) aus *Guillardia theta* wird in *Arabidopsis* Chloroplasten importiert

Ein Fusionsprotein aus dem vollständigen ORF467 (SufD) aus *Guillardia theta* und GFP wurde in Protoplasten aus *Arabidopsis thaliana* exprimiert (Abbildung 3.26). In diesem Experiment wurde gezeigt, dass die N-terminale Extension des Nucleomorph-kodierten ORF467 aus *Guillardia theta* in *Arabidopsis thaliana* ein funktionelles topogenes Signal für den Import in die Plastide darstellt.

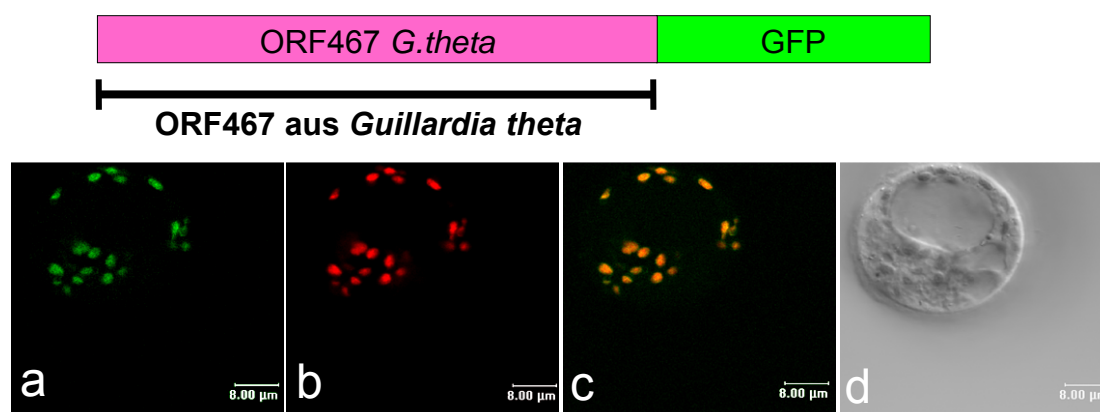


Abbildung 3.26. Plastidäre Lokalisation ORF467-GFP Fusionsprotein.

Expression eines GFP-Fusionsproteins von ORF467 (SufD) aus *Guillardia theta* in *Arabidopsis thaliana* Protoplasten. KLSM-Aufnahmen: **a**: GFP-Fluoreszenz, **b**: Autofluoreszenz, **c**: Überlagerung von **a** und **b**, **d**: Phaseninterferenzkontrast-Aufnahme. Maßstab 8 µm.

Die Experimente mit ORF467-GFP Fusionsprotein zeigten jedoch nicht die gleiche subplastidäre Verteilung der GFP-Fluoreszenz wie im Falle von ATNAP6 aus *Arabidopsis thaliana*. Es war eine gleichmäßig über das Stroma verteilte Fluoreszenz zu beobachten und keine Fluoreszenz in subplastidären Domänen.

3.3.5 2-Hybrid Interaktionsanalyse von ATNAP6

Die Interaktionsanalyse von ATNAP6 erfolgte nach Kapitel 2.6. Die Baitkonstrukte (Abbildung 3.27) wurden als Fusion mit der BD-Domäne (Abbildung 2.3) in den Vektor pAS2-1 kloniert und dieser in den Hefestamm Y190 (Clontech) transformiert. Als Prey-Bibliothek wurde eine cDNA

Bibliothek (ABRC-Code CD4-22) aus *Arabidopsis thaliana* verwendet, die cDNA wurde als Fusionskonstrukt mit der AD-Domäne in den Vektor pACT2 (Clontech) kloniert.

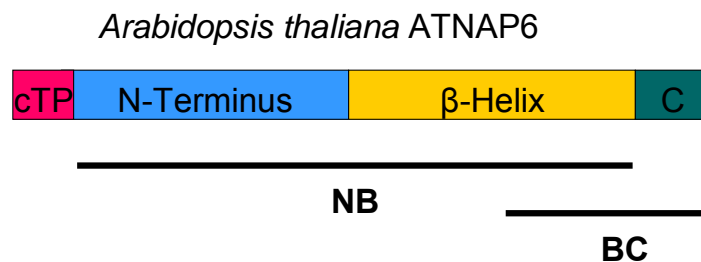


Abbildung 3.27. Konstrukte zur 2-Hybrid Interaktionsanalyse von ATNAP6.

Konstrukte NB und BC zur Interaktionsanalyse von ATNAP6 (SufD) aus *Arabidopsis thaliana*. Die Konstrukte enthalten die kodierenden Nukleotidsequenzen der durch die schwarzen Balken gekennzeichneten Bereiche von ATNAP6. cTP: Transitpeptid, C: C-terminale Domäne.

Die Identifikation von putativen Interaktoren erfolgte durch Kotransformation des Hefestammes Y190 mit dem Bait- und Preyplasmiden. Die Klone mit potentieller Interaktion wurden durch die Aktivierung des Reportergens *HIS3* auf Selektionsmedium identifiziert und anschließend auf die Aktivierung des zweiten Reportergens *lacZ* durch ein Filter-Lift-Assay überprüft. Die Preyplasmide wurden isoliert und die Interaktoren durch Sequenzierung analysiert. In der Tabelle 3.28 sind die identifizierten putativen Interaktionspartner aufgelistet.

Bait		<i>Arabidopsis</i> 2-Hybrid System	
NB	BC	Accession	BLAST-Ergebnis
	x	At5g43060	Cysteine proteinase RD21A precursor
	x	At4g11320	Cysteine proteinase, putative
	x	At3g21150	Zinc-finger (B-box type) family protein
x		At1g28660	Lipase, carboxylic ester hydrolase
x		At1g73260	Trypsin and protease inhibitor family protein
x		At2g42500	Serine/Threonine Protein phosphatase PP2A-4/A-3
	x	At2g05920	Subtilase family protein
x		At3g169010	AMP-dependent synthetase and ligase family protein

Tabelle 3.28. Hefe 2-Hybrid Interaktionsanalyse von ATNAP6.

Die Anzahl der identifizierten Klone ist in den Spalten B und C durch Kreuze dargestellt.

Die Interaktionsanalyse lieferte eine Anzahl von putativen Interaktionspartnern von ATNAP6 aus *Arabidopsis thaliana*. Die erhaltenen Interaktor-Sequenzen konnten uneingeschränkt zugeordnet werden, jedoch blieb die Anzahl der analysierbaren positiven Klone trotz mehrfacher Wiederholung der Interaktions-Screenings geringer als im *Guillardia theta* System mit ORF467 (Kapitel 3.1.7).

3.4 Charakterisierung einer *at1g32500* (*sufD*) T-DNA Insertionsmutante von *Arabidopsis thaliana*

Durch die vollständige Sequenzierung des *Arabidopsis thaliana* Genoms (The *Arabidopsis* Initiative, 2000) und die unter anderem vom Salk Institut durchgeführten Projekte zum Aufbau einer das vollständige Genom abdeckenden Generierung von T-DNA Insertionslinien (Alonso et al., 2003) ist es möglich geworden, Zugang zu einer großen Zahl von *Arabidopsis* Linien mit lokalisierbaren T-DNA Insertionen zu erhalten.

Die *Arabidopsis* T-DNA Insertionslinien des Salk Instituts wurden durch Transformation von *Arabidopsis thaliana* Ecotype Columbia-0 mit dem T-DNA Transformationsvektor pROK2 (Baulcombe et al., 1986) hergestellt. Die Bestimmung der Insertionsstelle im Genom von *Arabidopsis* erfolgte durch Sequenzierung eines vom linken Rand der T-DNA („Left border“) in die genomische DNA von *Arabidopsis* übergehenden DNA-Bereichs, der durch PCR amplifiziert wurde.

3.4.1 Die Salk T-DNA Insertionslinie N55595 enthält eine Insertion in *at1g32500*

Durch eine Datenbankanalyse der vorhandenen Salk T-DNA Insertionslinien (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>) konnte eine Linie identifiziert werden, deren vorhergesagte Insertionsstelle der T-DNA innerhalb des ersten Exons von *at1g32500* (*sufD*) lag. Die erhaltenen Samen der T3 Generation dieser *Arabidopsis*-Linie wurden kultiviert und die Pflanzen auf das Vorhandensein einer Insertion an der angegebenen Stelle des Chromosoms überprüft.

Zur Analyse der Pflanzen wurde genomische DNA aus Blattgewebe isoliert (Kapitel 2.4.2.3). In einer PCR mit drei Primern, zwei davon spezifisch für die flankierenden Bereiche um die

erwartete Insertionsstelle im *Arabidopsis* Chromosom I, einer spezifisch für den linken Rand der T-DNA, wurden die entsprechenden Bereiche der DNA amplifiziert und auf einem Agarosegel analysiert (Abbildung 3.29 A).

Bei Vorliegen einer T-DNA Insertion innerhalb des durch die flankierenden Primer LP und RP begrenzten Bereichs des Chromosoms war ein PCR-Produkt durch den T-DNA spezifischen Primer LB und den flankierenden Primer RP zu erwarten, das eine geringere Größe als das PCR-Produkt der Primer LP und RP aufweisen sollte (Abbildung 3.29 B).

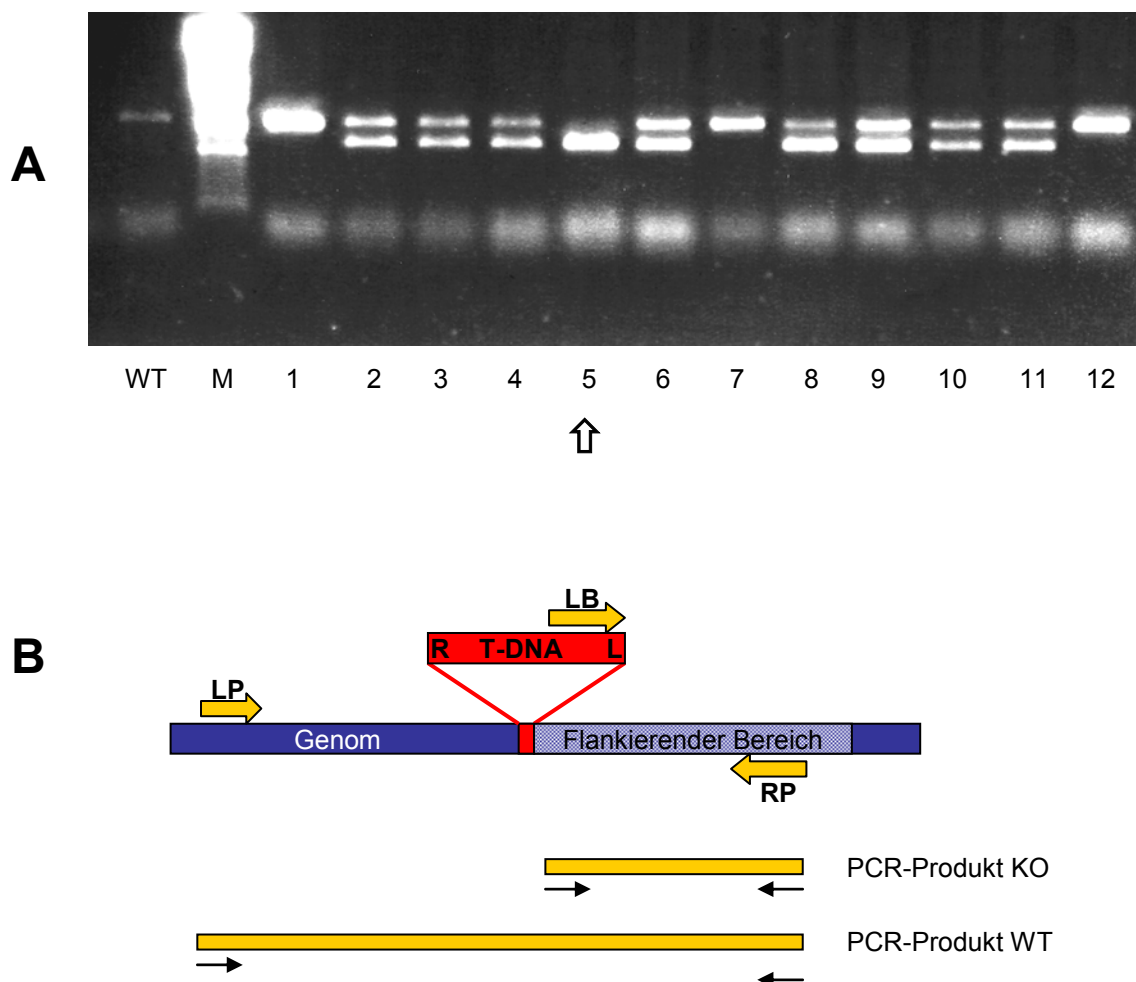


Abbildung 3.29. PCR-Analyse von *Arabidopsis thaliana* T-DNA Insertionsmutanten der Linie Salk N55595.

A: Analyse der PCR-Produkte aus genomischer DNA, durchgeführt nach dem in **B** dargestellten Schema. WT: Wildtyp-DNA, M: Markerspur, 1-12: DNA der Pflanzen 1 bis 12. Pfeil markiert homozygote Mutante Nr. 5.

B: Schema der Primerkombinationen für die PCR-Analyse. LP: Linker genomischer Primer, RP: Rechter genomischer Primer, LB: „Left Border“ Primer der T-DNA, Flankierender Bereich: In Salk Datenbank durch Sequenzierung aus dem linken Rand der T-DNA (L) enthaltene Sequenz. Abbildung B nicht maßstabsgetreu.

Eine vollständige homozygote Mutante sollte demnach bei einer PCR-Reaktion mit genomischer DNA mit den drei Primern LP, RP und LB ein PCR-Produkt von geringerer Größe als bei einer PCR-Reaktion mit Wildtyp DNA ergeben. Das Auftreten beider Banden deutet dementsprechend auf das Vorliegen einer heterozygoten Mutante hin.

Nach Auswertung der PCR Reaktion (Abbildung 3.29 A) konnte Pflanze Nr. 5 als homozygote T-DNA Insertionsmutante identifiziert werden. Für die weiteren Analysen wurden Proben dieser Pflanze verwendet und deren Samen für die nachfolgende Kultivierung homozygoter Mutanten verwendet.

3.4.2 Lokalisierung der T-DNA Insertionsstelle

Das durch eine PCR mit genomischer DNA und den Primern LB und RP amplifizierte Fragment der homozygoten *Arabidopsis thaliana* Mutante (Pflanze Nr.5, siehe Abbildung 3.25) wurde in den Klonierungsvektor pGEM-T ligiert und die Basensequenz durch Sequenzierung ermittelt. Nach Auswertung der Sequenzdaten ergab sich, dass die tatsächliche Insertion des linken Rands (Left border) der T-DNA 8 Basenpaare vor dem ATG Startcodon des *sufD* Gens (*at1g32500*) lag (Abbildung 3.30).

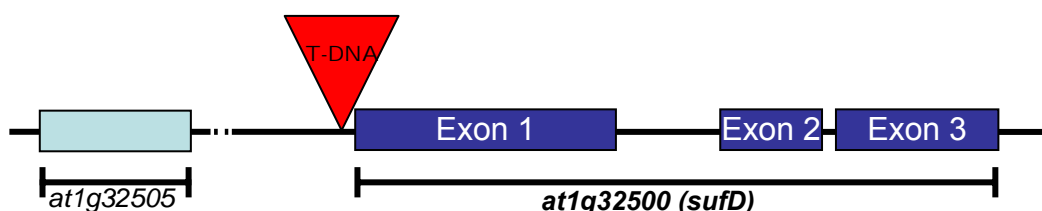


Abbildung 3.30. T-DNA Insertion in *Arabidopsis thaliana* Salk Linie N55595.

Schematische Darstellung der Insertionsstelle der T-DNA in Chromosom I. Das in 5'-Richtung auf Chromosom I vor *sufD* lokalisierte Pseudogen *at1g32505* wurde in einer Analyse durch eine PCR mit spezifischen Primern amplifiziert und in einer nachfolgenden Sequenzierung des PCR-Produkts intakt vorgefunden.

Nur in wenigen Fällen erfolgt die Insertion von T-DNA in das Pflanzengenom ohne Verlust von chromosomaler DNA. In der Regel sind jedoch nur kleinere Deletionen von 30-100 Basenpaaren zu beobachten. Da jedoch Fälle beschrieben wurden, bei denen durch das Insertionsereignis größere Bereiche bis hin zur Deletion von 10 und mehr kompletten Genen nachgewiesen wurden,

war eine Überprüfung der Insertionsstelle am rechten Rand der T-DNA erforderlich. Hierfür wurden durch PCR die auf dem Chromosom I in 5'-Richtung vor *atlg32500* (*sufD*) lokalisierten Gene amplifiziert und durch Sequenzierung überprüft. Dabei wurden alle Gene intakt vorgefunden. Die Insertion der T-DNA in Linie N55595 erfolgte somit ohne die Beeinflussung anderer Gene außer *atlg32500*.

Bei der Insertion von T-DNA in das Genom von *Arabidopsis thaliana* wurde in den Insertionslinien in vielen Fällen eine Insertion an mehr als einer Stelle im Genom nachgewiesen. Um im vorliegenden Fall ausschließen zu können, dass eine weitere unidentifizierte T-DNA in das Genom der Linie N55595 integriert worden war, wurde ein Southern Blot von genomischer DNA mit einer T-DNA spezifischen Oligonukleotidsonde auf das Vorliegen einer weiteren Insertion hin untersucht. Genomische DNA wurde nach Kapitel 2.4.2.3 isoliert und durch die Behandlung mit jeweils einer der drei Restriktionsendonukleasen *EcoRI*, *BamHI* und *HindIII* fragmentiert. Die fragmentierte DNA wurde in einem Agarosegel aufgetrennt und anschließend durch Southern-Blotting auf Nylonmembran übertragen. Eine T-DNA spezifische Oligonukleotidsonde wurde hergestellt, indem durch eine PCR mit genomischer DNA der Linie N55595 und den Primern NPTII_for und NPTII_rev ein Bereich der T-DNA amplifiziert wurde. Nach erfolgter Überprüfung des amplifizierten Fragments durch Sequenzierung wurde das DNA-Fragment mit Digoxigenin markiert und als Oligonukleotidsonde zur Detektion der T-DNA verwendet (Abbildung 3.31).

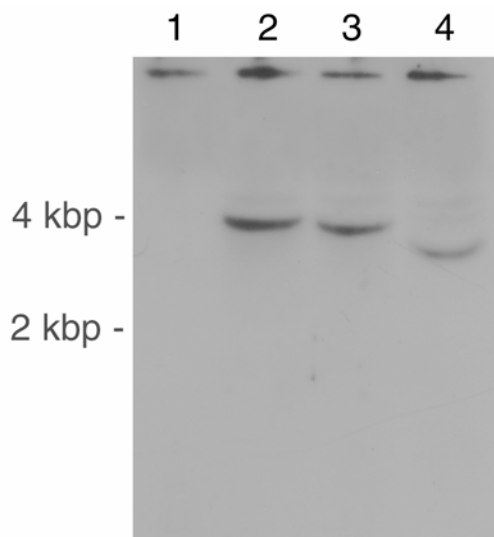


Abbildung 3.31. Die Salk Linie N55595 enthält nur eine T-DNA Insertion im Genom.

Southern Blot von genomischer DNA der homozygoten Mutante N55595, inkubiert mit einer DIG-markierten Oligonukleotidsonde gegen den NPT-Bereich der T-DNA. Spur 1: WT-DNA, Spur 2: N55595 DNA restringiert mit *EcoRI*, Spur 3: N55595 DNA restringiert mit *BamHI*, Spur 4: : N55595 DNA restringiert mit *HindIII*. Detektion erfolgte durch Schwärzung von Röntgenfilm durch Chemilumineszenz nach Inkubation des Blots mit anti-DIG Antikörper, gekoppelt an Alkalische Phosphatase und nachfolgender Behandlung mit CDP-Star Reagenz.

Durch die Detektion von jeweils nur einer Bande durch die T-DNA spezifische Sonde im Southern-Blot konnten mehrfache T-DNA Insertionen im Genom der Linie N55595 ausgeschlossen werden. Somit besaß die untersuchte *Arabidopsis* Linie eine einzige T-DNA Insertion unmittelbar vor dem Startcodon von *at1g32500* (*sufD*), so dass beobachtbare Unterschiede der Mutante im Vergleich zum Wildtyp Hinweise auf ein Fehlen des Genprodukts von *at1g32500* zurückgeführt werden können.

In Übereinstimmung mit der Nomenklatur von Möller et al. (2001) wird die *sufD* Mutante (Salk Linie N55595) im Folgenden als *atnap6* bezeichnet.

3.4.3 Phänotypische Analyse der *Arabidopsis sufD* Mutante *atnap6*

Die Kultivierung der homozygoten T-DNA Insertionsmutante zeigte während des gesamten Entwicklungszyklus der Pflanze gegenüber dem vergleichbaren Wildtyp ein insgesamt langsames Wachstum mit kleineren Blättern, eine spätere Entwicklung der Blüte und eine reduzierte Höhe des Hypokotyls (Abbildung 3.32).

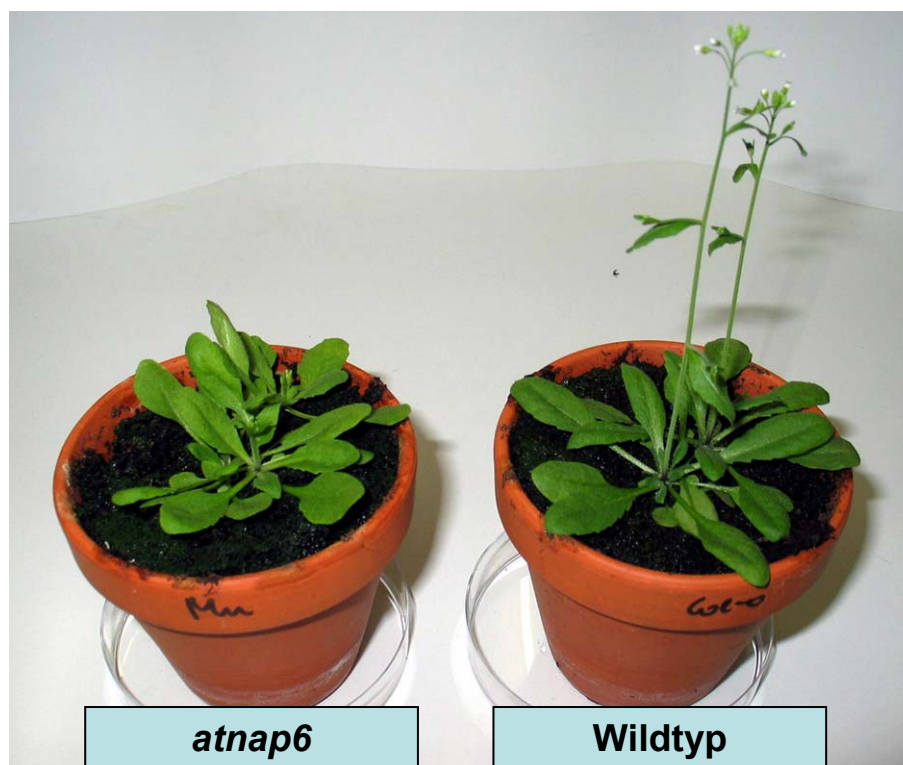


Abbildung 3.32. Vergleich von *atnap6*- und Wildtyp-Pflanzen.

Die Pflanzen wurden unter exakt gleichen Bedingungen kultiviert. Die *atnap6* Pflanzen zeigten eine hellere Grünfärbung der Blätter und verspätet einsetzendes Hypokotyl-Wachstum.

Neben einer helleren Grünfärbung des Blattgewebes der Mutante war mit fortschreitender Kultivierungsdauer eine deutlich früher auftretende Anthocyanin-Verfärbung der Blätter zu beobachten.

3.4.3.1 Die Mutante *atnap6* zeigt ein reduziertes Wurzelwachstum

Besonders deutlich ausgeprägte Wachstumsunterschiede zwischen Wildtyp und *atnap6* traten bei Betrachtung der in Flüssigmedium (Kapitel 2.4.1.3) kultivierten Wurzelkulturen in Erscheinung. Das Wurzelwachstum der Mutante *atnap6* war stark reduziert, wie eine Vergleichskultur des Wildtyps schon bei allgemeiner Beobachtung zeigte (Abbildung 3.33).

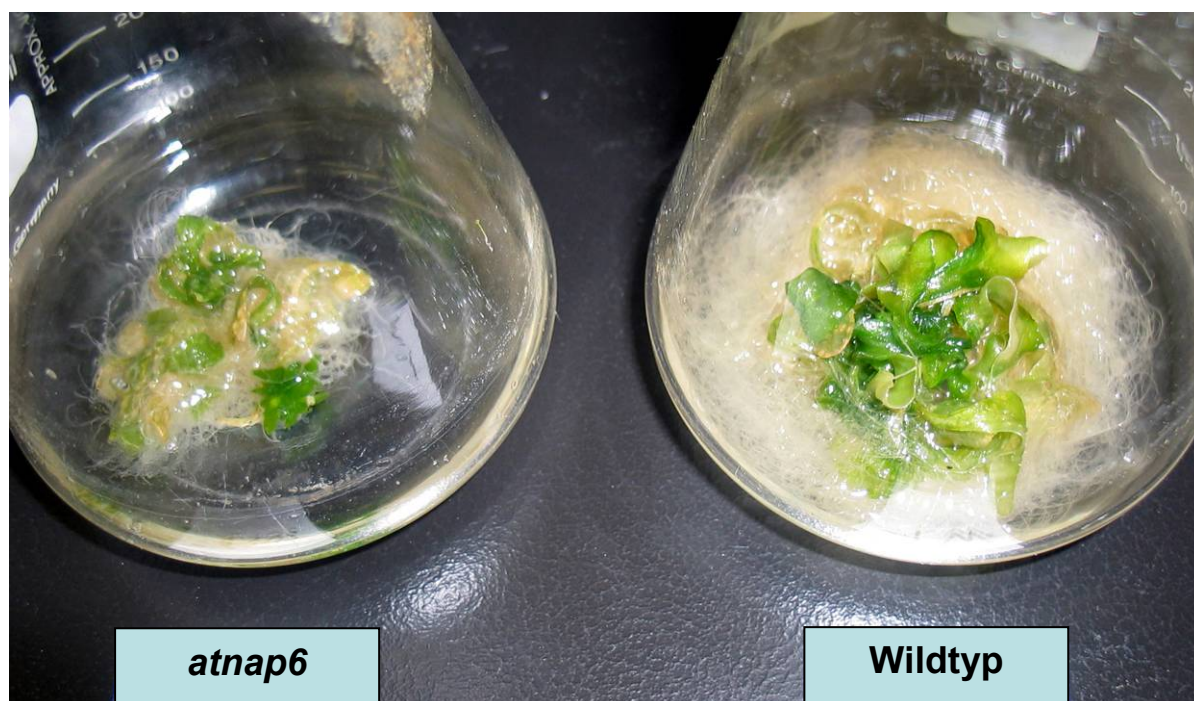


Abbildung 3.33. *atnap6* und Wildtyp Wurzelkultur in Flüssigmedium.

Eine gleiche Anzahl von Samen wurde in MS-Flüssigmedium (Kapitel 2.4.1.3) für 28 Tage unter identischen Bedingungen kultiviert.

Für eine nähere Bestimmung wurden Samen von *atnap6* und WT in Petrischalen auf feuchtem Filterpapier ausgesät und die Wurzellänge der ausgekeimten Samen nach 7 Tagen vermessen (Abbildung 3.34).

Die Ausbildung normal langer Wurzeln war in der Mutante beeinträchtigt. Diese Messung der Wurzellänge bestätigte den bereits optisch auffälligen Phänotyp der Wurzelkultur.

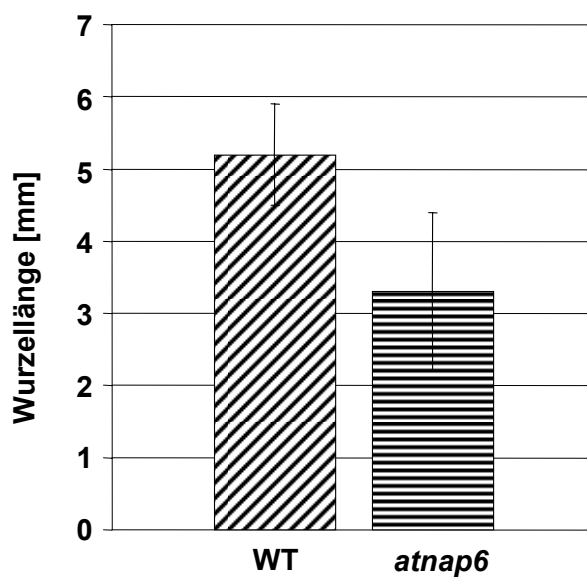


Abbildung 3.34. Vergleich der durchschnittlichen primären Wurzellänge von *atnap6* und Wildtyp.

Es wurden jeweils 60 Messungen zur Bildung des Durchschnittswerts durchgeführt. Der ermittelte Standardfehler ist im Diagramm angegeben.

3.4.3.2 *atnap6* bildet zahlreiche defekte und nicht keimfähige Samen aus

Ein hoher Prozentsatz der isolierten Samen der *atnap6* Pflanzen zeigte ein ungewöhnliches Erscheinungsbild, vielfach waren missgebildete und geschrumpfte Samen zu erkennen (Abbildung 3.35).

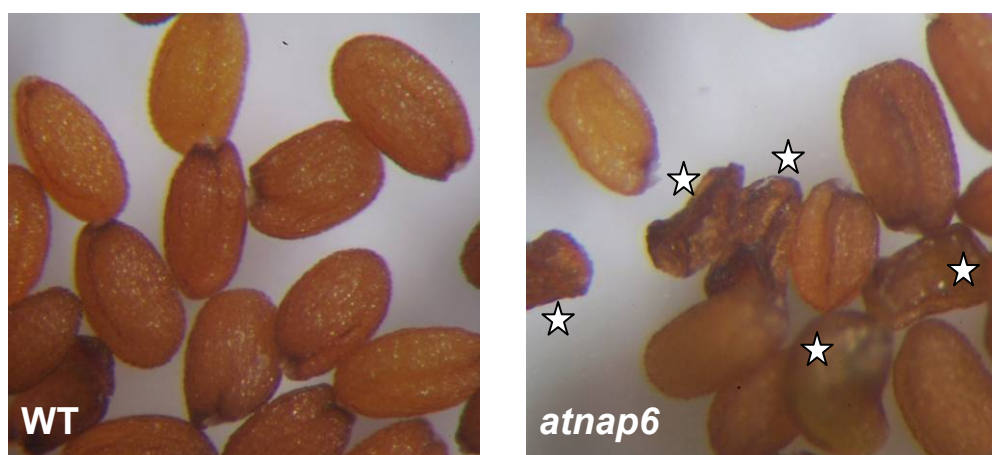


Abbildung 3.35. Reife Samen von Wildtyp und *atnap6* Pflanzen.

WT: ovale Wildtyp-Samen mit glatter Oberfläche. ***atnap6*:** geschrumpfte und missgebildete *atnap6*-Samen. Sterne markieren abortive Samen.

Die Untersuchung von mehreren Tausend Samen von *atnap6* und Wildtyp zeigte eine signifikante Häufung von embryonalen Defekten bei den *atnap6* Samen. Während Wildtyppflanzen überwiegend keimfähige Samen mit normal entwickelten Embryonen enthielten, waren *atnap6* Samen von einem Auftreten zahlreicher fehlentwickelter Embryonen gekennzeichnet (Abbildung 3.36).

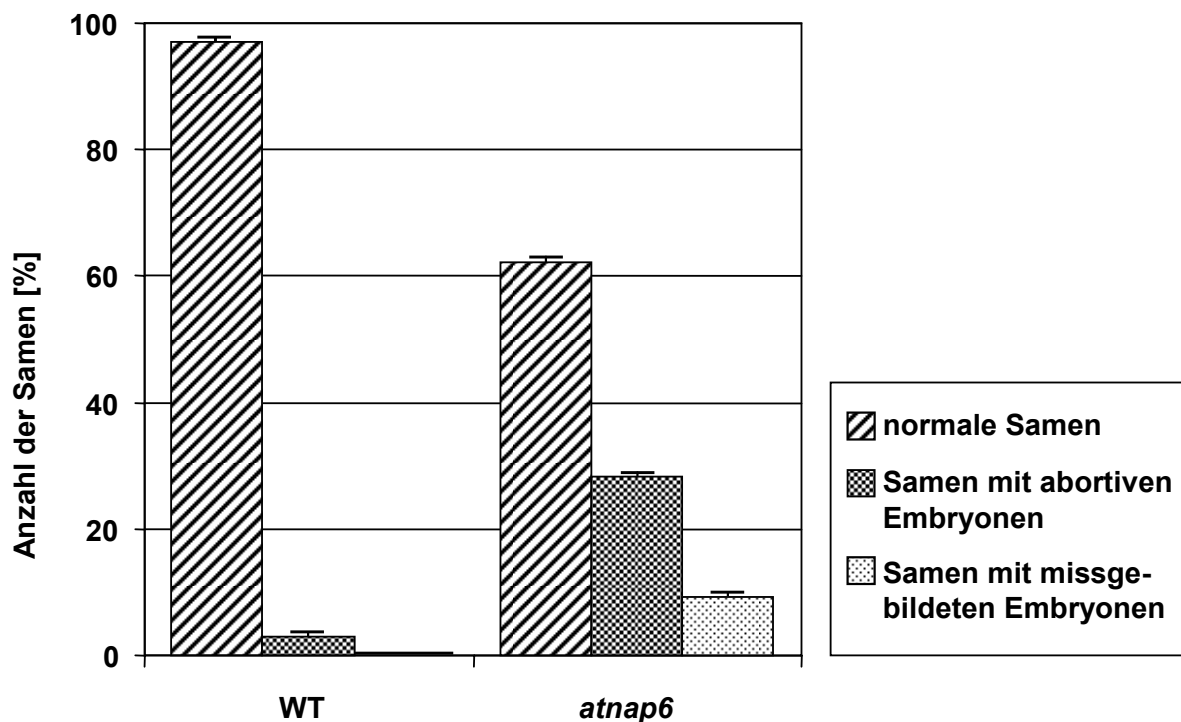


Abbildung 3.36. Samen-Phänotyp von Wildtyp und *atnap6* Pflanzen.

Eine Gesamtzahl von 1834 (Wildtyp) und 2182 (*atnap6*) Samen wurde analysiert. Von diesen Gesamtzahlen waren abortive Embryonen: 52 (Wildtyp), 619 (*atnap6*). Weitere 203 Samen von *atnap6* enthielten missgebildete, nicht lebensfähige Embryonen. Fehlerbalken geben die ermittelten Relativen Abweichungen an.

3.4.3.3 Embryonaldefekte von *atnap6*

Die lichtmikroskopische Untersuchung der *atnap6* Embryonen zeigte eine Anzahl von Entwicklungsdefekten zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Embryonalentwicklung. Am häufigsten war ein Verbleiben des Embryos im globulären Stadium zu beobachten (Abbildung 3.37 a). Andere Embryonen waren im Torpedostadium oder zu anderen Punkten der Entwicklung arretiert und zeigen ein verdicktes Hypokotyl und kleine Kotyledonen (Abbildung 3.37 c und d).

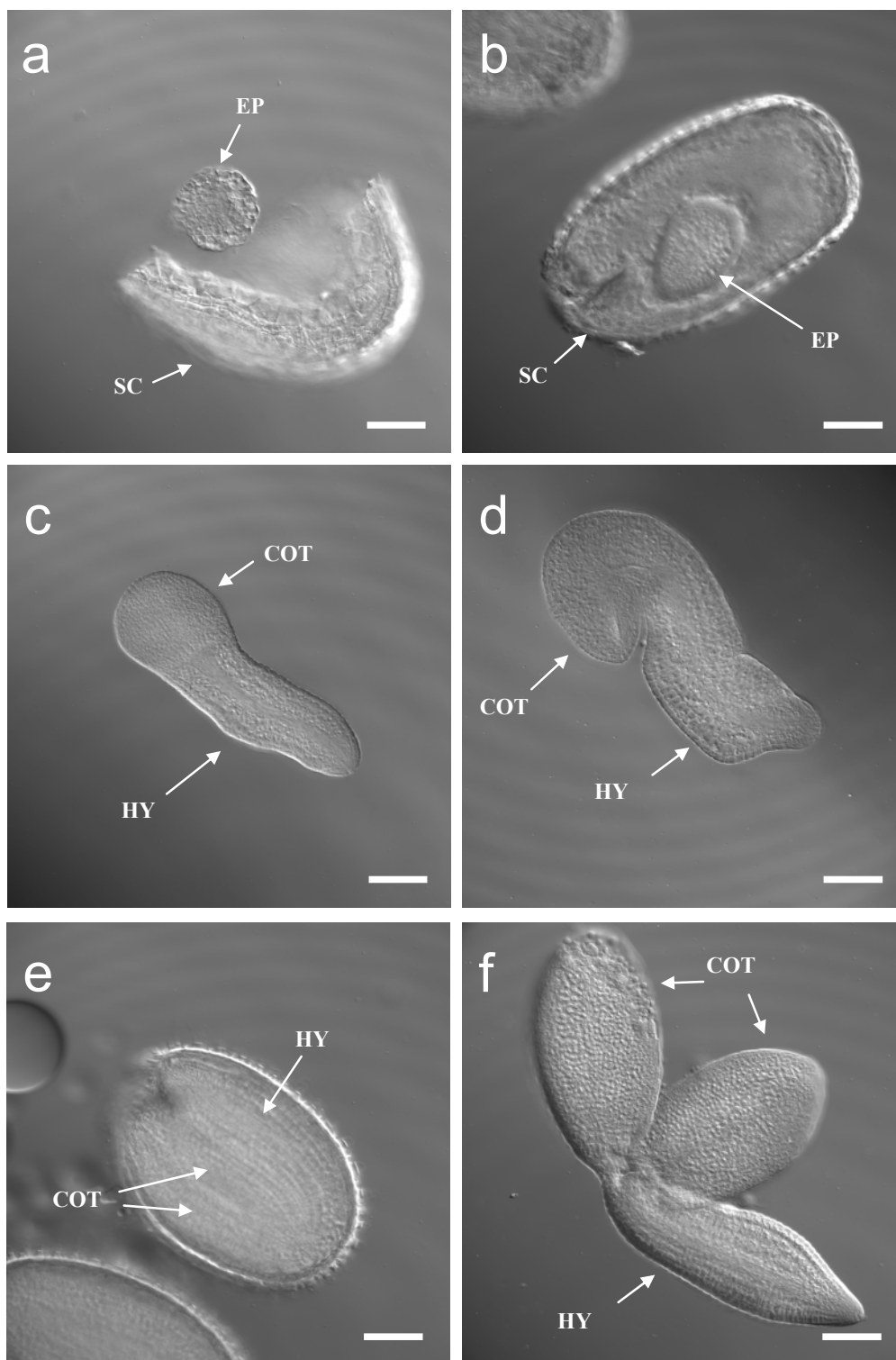


Abbildung 3.37. Lichtmikroskopische Aufnahmen von *atnap6* und WT Embryonen.

a-d: isolierte *atnap6* Embryos aus abortiven Samen. **a:** im globulären Stadium arretierter Embryo. **b:** Länglicher Embryo mit Arretierung in früher Phase der Strukturierung. **c** und **d:** Embryonen mit Arretierungen im Torpedo- und „Bent-Cotyledon“ Stadium, erkennbar sind verdickte Hypokotyle und kleine Kotyledonen.

e: WT Samen mit normal entwickeltem, reifen Embryo im Bent-Cotyledon Stadium. **f:** freigelegter WT Embryo im gleichem Stadium wie **e**.

HY: Hypokotyl, COT: Kotyledon, EP: eigentliches Embryo, SC: Samenhülle. Differential-Interferenz-Kontrast (Nomarski) Aufnahmen. Maßstab 100 μm .

3.4.3.4 *atnap6* Pflanzen weisen einen reduzierten Chlorophyllgehalt auf

Der Vergleich von *atnap6* und Wildtyp Pflanzen zeigte eine erkennbare hellere Grünfärbung der Blätter der *atnap6* Mutante (Abbildung 3.32). Dies war ein Hinweis auf einen möglichen reduzierten Chlorophyllgehalt der Mutante. Durch eine Bestimmung des Chlorophyllgehalts (Kapitel 2.4.3.12) in Proben von Blattgewebe von jeweils 10 Pflanzen von Wildtyp und *atnap6* wurde diese Vermutung bestätigt. Die *atnap6* Mutante zeigte einen um 30 % reduzierten Gehalt an Chlorophyll im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 3.38).

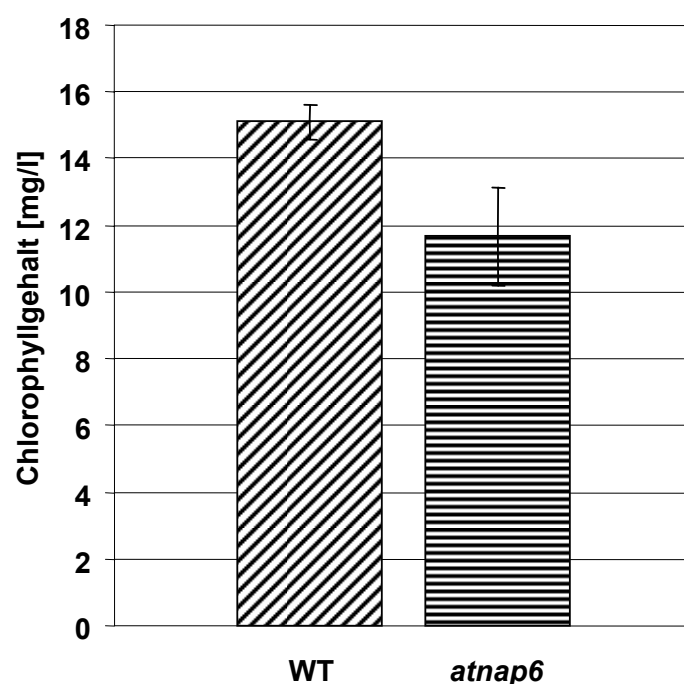


Abbildung 3.38. Chlorophyllgehalt von *atnap6* und Wildtyp.

Je 10 unabhängige Messungen wurden zur Bestimmung des Durchschnittswertes durchgeführt. Der jeweilige Standardfehler ist im Diagramm dargestellt.

3.4.3.5 Plastiden von *atnap6* zeigen eine veränderte Thylakoidstruktur

Da ATNAP6 ein plastidär lokalisiertes Protein ist, wurde im nächsten Schritt eine eventuelle Beeinträchtigung auf der Ebene der Plastiden in der Mutante untersucht. Durch die elektronenmikroskopische Untersuchung von Ultradünnschnitten aus Blattgewebe von *atnap6*

Pflanzen wurden strukturelle Veränderung in den Plastiden der Mutante *atnap6* identifiziert (Abbildung 3.39).

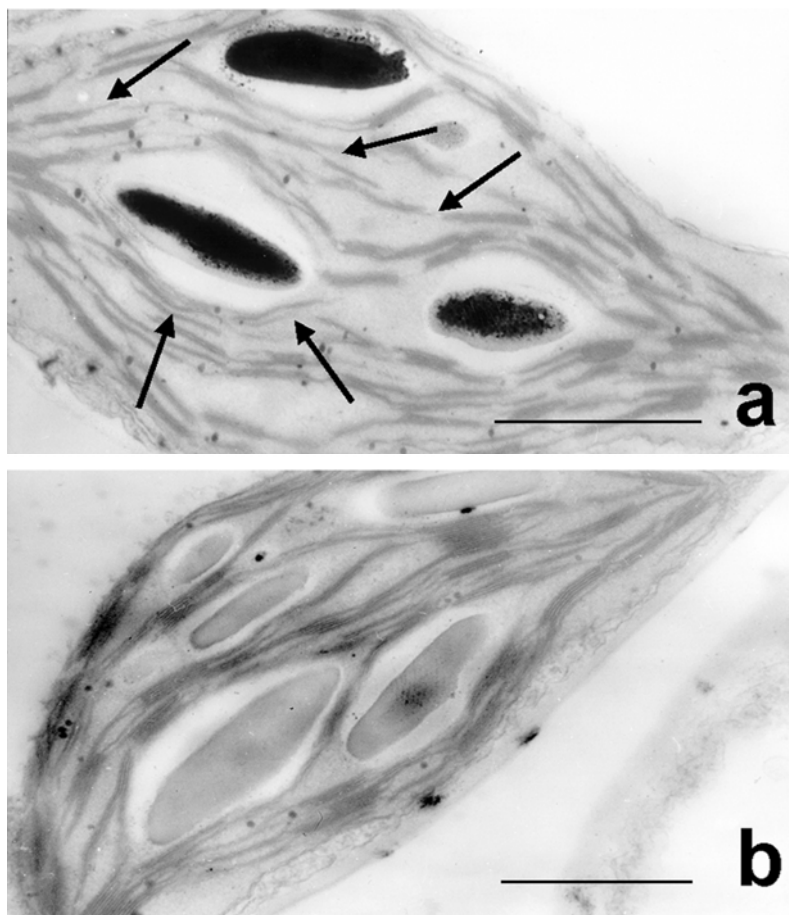


Abbildung 3.39. Vergleich von *atnap6* und Wildtyp Plastiden.

a: Plastide von *atnap6*. Pfeile zeigen ungleichmäßige Granastapelung der Thylakoide. **b:** Wildtyp Plastide. Maßstab 2 µm.

Die Thylakoide der Mutante *atnap6* wiesen gegenüber dem WT eine unregelmäßigere Granastapelung auf. Die Thylakoide erschienen ungeordneter in der Anordnung und kürzer als im Wildtyp. Die Größe und Anzahl der Plastiden pro Zelle war nicht verändert.

3.4.3.6 Zusammenfassung der phänotypischen Analyse von *atnap6* Pflanzen

Die T-DNA Insertionsmutante N55595 trägt eine Insertion unmittelbar vor dem Startcodon des für SufD kodierenden Gens *atlg32500*. Diese Mutation verursachte einen ausgeprägten Defekt der Embryonalentwicklung. Ein hoher Prozentsatz der Samen enthielt abortive oder

missgebildete und nicht lebensfähige Embryonen. Das Wachstumsverhalten der Pflanzen war im Vergleich zu Wildtyppflanzen generell verzögert, die Länge der Primärwurzeln war stark reduziert und die Wuchshöhe der Pflanzen war deutlich verringert. Das Blattgewebe zeigte eine hellere Grünfärbung als der Wildtyp. Dies wurde durch einen reduzierten Chlorophyllgehalt des Blattgewebes bestätigt. Eine früher einsetzende Verfärbung des Blattgewebes (Anthocyanin Rotverfärbung) deutete auf eine möglicherweise früher als im Wildtyp beginnende Seneszens der *atnap6* Mutante hin. Ultrastrukturelle Untersuchungen zeigten eine Veränderung der Thylakoide in den Chloroplasten, hierbei war eine ungleichmäßige und ungeordnete erscheinende Stapelung der Grana auffällig.

3.5 Genchip Expressionsanalyse von WT und *atnap6* Pflanzen

Zur Aufklärung der Funktion eines unbekannten Proteins ist es hilfreich, die Gene zu kennen, deren Expression gleichzeitig mit dem Gen des zu analysierenden Proteins reguliert wird. Im Falle einer Knock-out Mutation kann der direkte Vergleich der im Wildtyp vorhandenen globalen Expressionsmuster mit den Expressionsmustern, die in der Mutante vorliegen, potentielle Hinweise auf die mögliche Funktion des ausgeschalteten Gens liefern.

Zur Erhaltung aussagekräftiger Vergleichsdaten wurden Wildtyp und *atnap6* Pflanzen unter identischen Wachstumsbedingungen kultiviert. Nach 12 Tagen wurde Blattgewebe von jeweils 30-50 Pflanzen geerntet und die Gesamt-RNA nach Kapitel 2.4.2.5 isoliert. Durch die Verwendung von vereinigttem Blattgewebe von zahlreichen Pflanzen wurden statistische Variationen aufgrund unterschiedlichen Pflanzenwachstums einzelner Pflanzen ausgemittelt.

Die Qualität der isolierten RNA wurde durch die Analyse mit dem Bioanalyzer-System der Firma Agilent überprüft, eine erneute Überprüfung wurde nach der Synthese der Biotin-markierten cRNA aus der cDNA und erneut nach deren Fraktionierung unmittelbar vor der Hybridisierung der Microarrays durchgeführt (Abbildung 3.40).

Aus den Elektropherogrammen in Abbildung 3.40 B ließ sich die Ausbeute und die Größenverteilung der Biotin-markierten cRNA-Transkripte bestimmen, die durchschnittliche Größe der Transkripte betrug etwa 1500 Nukleotide.

In der nachfolgenden Fragmentierung wurden die Transkripte durch Hydrolyse in 35-200 Nukleotide große Fragmente überführt. Die durchschnittliche Größe der Fragmente betrug nach der elektrophoretischen Analyse ungefähr 100 Nukleotide (Abbildung 3.40 C). Die fragmentierte cRNA der WT und *atnap6* Proben wurde anschließend für die Hybridisierung der Microarrays verwendet.

Die Hybridisierung der markierten cRNA auf den Microarray-Chip erfolgte nach den Protokollen des Herstellers über einen Zeitraum von 16 Stunden bei 45 °C und 60 rpm. Die anschließenden Waschschritte wurden in der Affymetrix Fluidics Station automatisiert nach einem vorgegebenen Programm durchgeführt. Direkt im Anschluß erfolgte die Detektion der Fluoreszenz bei 570 nm Wellenlänge im Fluoreszenz-Scanner.

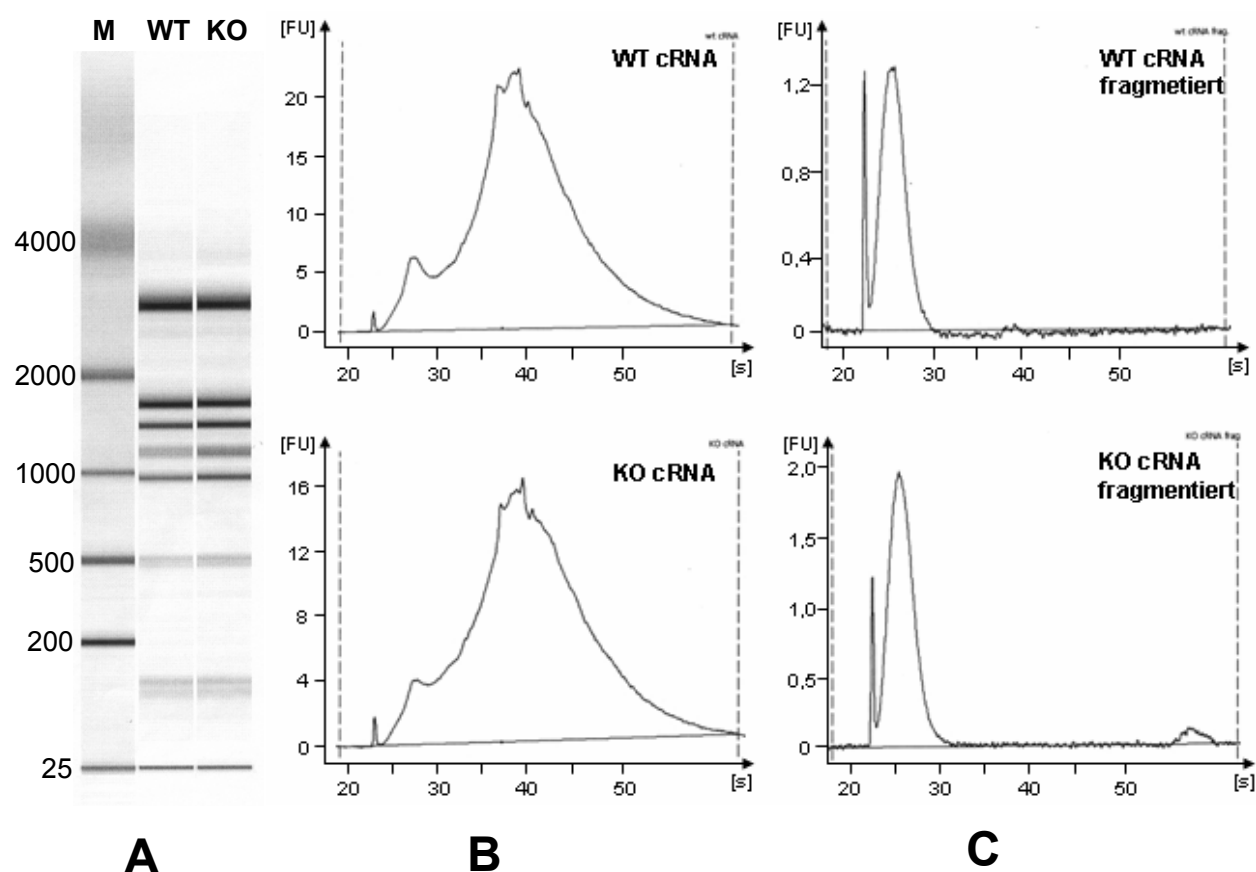


Abbildung 3.40. Kontrolle der RNA-Präparationen.

A: Gesamt-RNA aus WT und *atnap6* (KO) Blattgewebe, M: Marker (Nukleotide angegeben). **B:** Elektropherogramm der Biotin-markierten cRNA nach Analyse mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer, y-Achse: Fluoreszenz [FU], x-Achse: Zeit [s]. **C:** Elektropherogramm der cRNA nach Fragmentierung, Achsen siehe **B**.

Die von dem Scanner gelieferten Rohdaten der Fluoreszenzmessungen der Wildtyp- und *atnap6*-Microarrays wurden mit dem Computer-Programm dChip Ver. 1.3 (<http://biosun1.harvard.edu/complab/dchip/>) und der Statistiksoftware R (Ihaka und Gentleman, 1996; <http://www.r-project.org/>) normalisiert.

Diese Normalisierung der absoluten Meßwerte mithilfe von auf dem Microarray enthaltener Kontrollfelder ermöglichte den späteren Vergleich der Expressionsdaten von verschiedenen Arrays untereinander. Es wurde die Methode der „Invariant Set Normalization“ von Li und Wong (Li und Wong, 2001) verwendet.

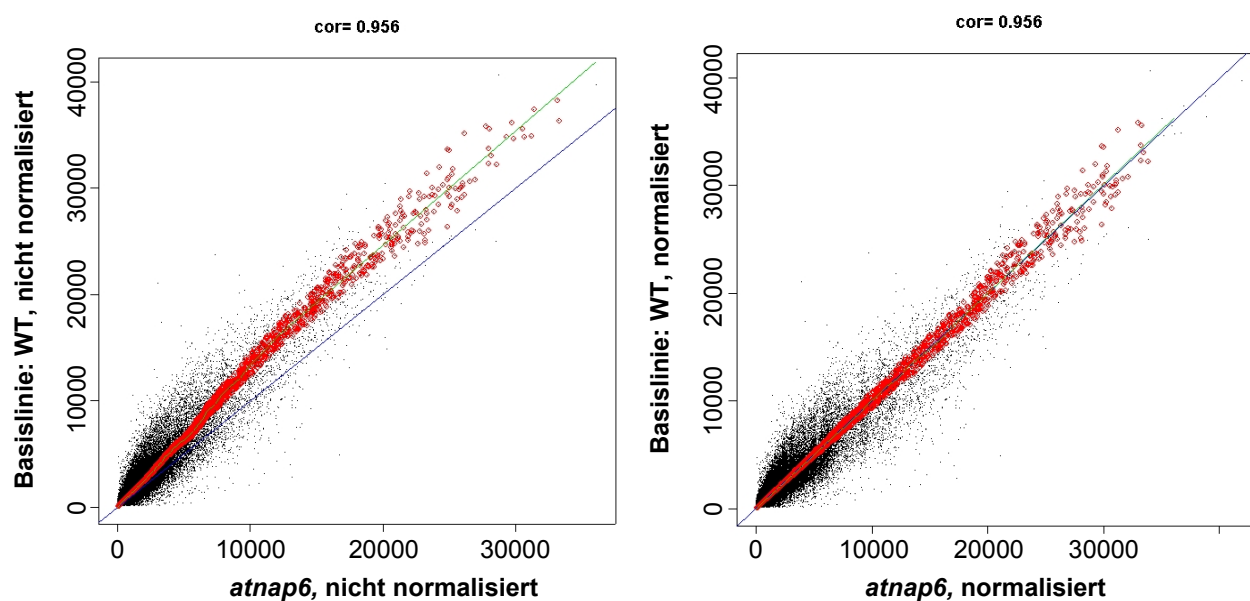


Abbildung 3.41. Korrelation der Microarray-Expressionsdaten.

Linkes Diagramm: Korrelation vor Normalisierung. WT-Array als Basislinie. Rote Meßpunkte zeigen die für die Normalisierungsberechnung verwendeten „invarianten“ Sonden an (siehe Li und Wong, 2001). Die Abweichung (grüne Ausgleichsgerade) der Meßwerte von der Gerade $y = x$ (blau) beruht auf den unterschiedlichen Fluoreszenz-Intensitäten der Wildtyp- und *atnap6*-Microarrays.

Rechtes Diagramm: Korrelation nach Normalisierung. cor = Korrelationskoeffizient. Die Ausgabe der Diagramme erfolgte mit der Software R, Version 2.0.1 (<http://www.r-project.org/>) über das Programm dChip.

3.5.1 Vergleich der Expressionsmuster von *atnap6* und WT

Nach der Normalisierung der Expressionsdaten wurden Gene, deren Expressionswerte sowohl in WT und *atnap6* unterhalb von eines Wertes von 250 lagen, herausgefiltert. Dies erfolgte, um eine Beeinträchtigung der Auswertung durch nicht exprimierte Gene (Gene mit „Absent Call“ in

Affymetrix-Datenanalyse), deren Expressionswerte zudem häufig einen rein rechnerisch hohen Änderungsfaktor zwischen WT und *atnap6* aufwiesen, zu vermeiden.

Gene mit einer sich um mindestens den Faktor 3 unterscheidenden Expression zwischen Wildtyp und *atnap6* und einer Expression oberhalb des Cut-Off-Werts von 250 wurden für die Auswertung verwendet (Tabellen 3.42 und 3.43).

3.5.1.1 *atnap6* Gene mit veränderter Expression

Alle Gene von *atnap6*, deren Expression mindestens um den Faktor 3 gegenüber dem Wildtyp erhöht war, sind in Tabelle 3.42 aufgeführt.

Änderung x-fach	Accession	Gen	WT	KO
54.76	At5g54060	glycosyltransferase family protein	32.15	1760.49
51.37	At4g22870	leucoanthocyanidin dioxygenase, putative	59.45	3054.43
47.85	At5g42800	dihydroflavonol 4-reductase (dihydrokaempferol 4-reductase) (DFR)	54.34	2599.84
45.3	At5g17220	glutathione S-transferase, putative	71.38	3233.67
37.45	At1g03495	pseudogene, transferase family	45.9	1719.16
33.07	At1g66390	myb family transcription factor, putative / production of anthocyanin pigment 2 protein (PAP2)	32.15	1063.13
29.55	At4g14090	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	48.22	1425.25
22.86	At1g56650	myb family transcription factor (MYB75)	52.05	1189.67
18.13	At4g01390	meprin and TRAF homology domain-containing protein / MATH domain-containing protein	50.96	923.99
13.53	At1g34040	alliinase family protein	81.17	1098.22
11.33	At1g61800	glucose-6-phosphate/phosphate translocator, putative	59.28	671.35
10.85	At2g41380	embryo-abundant protein-related	32.15	348.81
9.82	At1g56600	galactinol synthase, putative	145.92	1432.68
8.01	At1g74810	anion exchange family protein	136.29	1091.68
7.92	At3g16360	phosphotransfer family protein	32.15	254.63
7.78	At2g25625	expressed protein	178.38	1388.13
7.33	At1g76960	expressed protein	325.73	2388.96
7.31	At5g07990	flavonoid 3'-monooxygenase / flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H) / cytochrome P450 75B1 (CYP75B1)	104.46	763.86
6.63	At5g59700	protein kinase, putative	53.32	353.65
6.47	At5g22300	nitrilase 4 (NIT4)	613.23	3965.75
6.42	At2g14610	pathogenesis-related protein 1 (PR-1)	220.64	1417.34
6.37	At1g64360	expressed protein	594.72	3789.88
6.34	At3g62960	glutaredoxin family protein	333.47	2113.27
6.17	At3g29590	transferase family protein	66.86	412.61
6.16	At4g33040	glutaredoxin family protein	265.15	1633.85
5.85	At1g80130	expressed protein	764.99	4471.98
5.83	At5g44420	plant defensin-fusion protein, putative (PDF1.3)	228.98	1334.13
5.3	At2g17710	expressed protein	259.87	1377.76
5.21	At4g12280	copper amine oxidase family protein	111.07	578.45

5.18	At2g18660	expansin family protein (EXPR3)	116.72	604.81
5.15	At5g18130	expressed protein	384.17	1978.12
5.11	At5g16570	glutamine synthetase, putative	220.41	1126.7
5.03	At4g32940	vacuolar processing enzyme gamma / gamma-VPE	2213.85	11136.3
4.71	At2g18050	histone H1-3 (HIS1-3)	81.27	382.72
4.67	At4g23140	receptor-like protein kinase 5 (RLK5)	127.05	592.82
4.65	At5g53420	expressed protein	671.43	3121.83
4.62	At3g52180	protein tyrosine phosphatase/kinase interaction sequence protein (PTPKIS1)	310.21	1433.1
4.54	At1g55760	BTB/POZ domain-containing protein	66.06	299.91
4.54	At1g30500	CCAAT-binding transcription factor (CBF-B/NF-YA) family protein	168.43	764.82
4.47	At2g40130	heat shock protein-related	87.07	389.53
4.4	At4g23990	cellulose synthase family protein	292.02	1284.92
4.13	At3g57260	glycosyl hydrolase family 17 protein	389.82	1608.95
4.03	At5g23020	2-isopropylmalate synthase 2 (IMS2)	165.32	666.21
3.99	At4g15620	integral membrane family protein	203.42	812.28
3.92	At1g23040	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	383.86	1506.32
3.89	At1g52880	no apical meristem (NAM) family protein	394.15	1534.94
3.81	At4g09020	isoamylase, putative / starch debranching enzyme, putative	97.45	371.67
3.81	At1g22160	senescence-associated protein-related	660.94	2516.99
3.78	At5g59050	expressed protein	339.05	1282.55
3.77	At5g11930	glutaredoxin family protein	168.98	637.52
3.76	At1g62710	vacuolar processing enzyme beta / beta-VPE	170.8	642.28
3.75	At1g14870	expressed protein /// expressed protein	656.57	2463.71
3.7	At4g24450	starch excess protein-related	190.74	704.86
3.67	At3g22840	chlorophyll A-B binding family protein / early light-induced protein (ELIP)	1455.44	5343.34
3.65	At1g13990	expressed protein	281.44	1027.28
3.64	At2g24850	aminotransferase, putative	248.62	905.33
3.63	At2g26020	plant defensin-fusion protein, putative (PDF1.2b)	330.96	1200.33
3.59	At1g11700	expressed protein	395.79	1422.53
3.56	At3g28290	integrin-related protein 14a	273.09	973.15
3.55	At3g11010	disease resistance family protein / LRR family protein	159.53	566.46
3.46	At1g15410	aspartate-glutamate racemase family	570.09	1973.39
3.45	At5g45380	sodium:solute symporter family protein	264.16	911.81
3.45	At1g77920	bZIP family transcription factor	290.65	1003.12
3.38	At2g36970	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	255.69	864.94
3.21	At4g14020	rapid alkalization factor (RALF) family protein	533.02	1708.43

Tabelle 3.42. Änderung der Expression in *atnap6*.

Erste Spalte: Änderung der Expression gegenüber Wildtyp. Dritte Spalte: Annotierung aus Affymetrix *Arabidopsis*-Datenbank (<https://www.affymetrix.com/analysis/netaffx/index.affx>), Stand: April 2005. Spalte 4 und 5: Normalisierte Expressionsdaten nach Auswertung mit dChip. Nicht berücksichtigt wurden Gene mit Expressionswerten unterhalb von 250 in WT und *atnap6*.

Die Gene, deren Expression mindestens um den Faktor 3 gegenüber dem Wildtyp reduziert war, sind in Tabelle 3.43 aufgelistet.

Änderung x-fach	Accession	Gen	WT	<i>atnap6</i>
-46.01	At2g20870	cell wall protein precursor, putative	1790.83	38.93
-22.09	At1g28290	pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein	1475.01	66.77
-19.51	At3g51590	lipid transfer protein, putative	627.1	32.15
-19.3	At4g29030	glycine-rich protein	1012.17	52.46
-16.49	At3g48360	speckle-type POZ protein-related	1996.93	121.1
-15.34	At1g78860	curculin-like (mannose-binding) lectin family protein	2276.59	148.44
-14.63	At5g44160	zinc finger (C2H2 type) family protein	697.65	47.69
-13.66	At5g62080	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein	439.06	32.15
-13.64	At4g15690	glutaredoxin family protein	438.6	32.15
-13.63	At5g22430	expressed protein	826.17	60.59
-13.59	At4g15680	glutaredoxin family protein	437.03	32.15
-13.52	At1g68875	expressed protein	434.51	32.15
-13.27	At1g57750	cytochrome P450, putative	426.75	32.15
-12.07	At5g62920	two-component responsive regulator / response regulator 6 (ARR6)	388.14	32.15
-11.48	At5g33370	GDSL-motif lipase/hydrolase family protein	747.09	65.06
-10.72	At5g45670	GDSL-motif lipase/hydrolase family protein	639.56	59.65
-9.95	At4g15660	glutaredoxin family protein	629.94	63.34
-9.64	At2g42840	protodermal factor 1 (PDF1)	2054.1	213.08
-8.88	At4g23750	AP2 domain-containing transcription factor, putative	285.39	32.15
-8.87	At1g67990	caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase, putative	285.18	32.15
-8.47	At2g20720	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein	314.16	37.07
-8.41	At5g07230	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein	270.47	32.15
-8.3	At3g45970	expansin family protein (EXPL1)	1454.2	175.22
-8.1	At1g21910	AP2 domain-containing transcription factor family protein	1319.88	162.96
-7.86	At1g50040	expressed protein	434.17	55.22
-7.75	At4g30280	xyloglucan:xyloglucosyl transferase, putative	311.2	40.15
-7.34	At3g08770	lipid transfer protein 6 (LTP6)	3291.86	448.52
-7.32	At4g14080	glycosyl hydrolase family 17 protein / anther-specific protein (A6)	235.28	32.15
-6.94	At1g66850	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein	459.4	66.21
-6.73	At1g35140	phosphate-responsive protein, putative	2772.96	412.09
-6.65	At5g23940	transferase family protein	289.61	43.55
-6.38	At4g31840	plastocyanin-like domain-containing protein	1008.53	158.14
-6.29	At2g02100	plant defensin-fusion protein, putative (PDF2.2)	1792.19	284.86
-6.12	At1g03020	glutaredoxin family protein	337.08	55.08
-6.08	At1g19050	two-component responsive regulator / response regulator 7 (ARR7)	2035.28	334.48
-6.05	At2g06850	xyloglucan:xyloglucosyl transferase / xyloglucan endotransglycosylase	4549.15	752.33
-5.99	At5g20250	raffinose synthase family protein / seed imbibition protein, putative (din10)	3062.54	511.15
-5.84	At1g06350	fatty acid desaturase family protein	879.48	150.52
-5.73	At3g48100	two-component responsive regulator / response regulator 5 (ARR5) / response reactor 2 (RR2)	657.36	114.68
-5.49	At3g23220	ethylene-responsive element-binding protein, putative	1089.21	198.23
-5.4	At1g18250	thaumatin, putative	406.53	75.23
-5.3	At3g44750	histone deacetylase, putative (HD2A)	714.91	134.97
-5.29	At1g22330	RNA recognition motif (RRM)-containing protein	253.82	48.02
-5.29	At1g62480	vacuolar calcium-binding protein-related	1082.73	204.71
-5.29	At4g37240	expressed protein	1419.91	268.18
-5.25	At3g62930	glutaredoxin family protein	284.98	54.29
-5.22	At3g57150	dyskerin, putative / nucleolar protein NAP57, putative	820.03	157.13
-5.16	At3g28500	60S acidic ribosomal protein P2 (RPP2C)	605.41	117.41
-4.97	At4g15700	glutaredoxin family protein /// glutaredoxin family protein	661.08	132.97

-4.85	At5g07030	aspartyl protease family protein	458.37	94.43
-4.84	At3g54560	histone H2A.F/Z	359.48	74.2
-4.78	At4g34950	nodulin family protein	1444.56	302.37
-4.75	At5g47500	pectinesterase family protein	478.29	100.65
-4.71	At2g43590	chitinase, putative	416.23	88.45
-4.65	At3g18130	guanine nucleotide-binding family protein / activated protein kinase C receptor (RACK1)	1707.92	367.62
-4.64	At5g07550	glycine-rich protein (GRP19)	346.22	74.67
-4.6	At1g56110	nucleolar protein Nop56, putative	882.8	191.75
-4.52	At1g61070	plant defensin-fusion protein, putative (PDF2.4)	301.09	66.61
-4.49	At1g75910	family II extracellular lipase 4 (EXL4)	298.5	66.42
-4.43	At3g16670	expressed protein	4926.93	1112.55
-4.41	At1g48630	guanine nucleotide-binding family protein / activated protein kinase C receptor, putative / RACK, putative	2109.87	478.09
-4.37	At4g31000	calmodulin-binding protein	309.52	70.9
-4.32	At4g25630	fibrillarin 2 (FIB2)	558.42	129.35
-4.31	At2g27080	harpin-induced protein-related / HIN1-related / harpin-responsive protein-related	605.09	140.44
-4.3	At3g53460	29 kDa ribonucleoprotein, chloroplast / RNA-binding protein cp 29	4059.34	944.48
-4.29	At3g23830	glycine-rich RNA-binding protein, putative	539.46	125.65
-4.29	At1g49500	expressed protein	5461.4	1274
-4.26	At2g40400	expressed protein	637.48	149.71
-4.26	At1g03220	extracellular dermal glycoprotein, putative / EDGP, putative	1933.31	453.43
-4.22	At1g08560	syntaxin-related protein KNOLLE (KN) / syntaxin 111 (SYP111)	379.15	89.78
-4.12	At1g06080	delta 9 desaturase (ADS1)	828.09	201.19
-4.12	At1g04040	acid phosphatase class B family protein	1024.1	248.39
-4.08	At2g25810	tonoplast intrinsic protein, putative	1095.88	268.71
-4.04	At5g36910	thionin (THI2.2)	1451.29	359.09
-4.03	At3g17170	ribosomal protein S6 family protein (RFC3)	715	177.64
-3.96	At4g02330	pectinesterase family protein	403.51	101.8
-3.96	At2g28630	beta-ketoacyl-CoA synthase family protein	652.86	165.04
-3.96	At3g53190	pectate lyase family protein	885.7	223.46
-3.95	At2g35710	glycogenin glucosyltransferase (glycogenin)-related	683.36	173.21
-3.92	At3g07050	GTP-binding family protein	318.99	81.42
-3.92	At1g02640	glycosyl hydrolase family 3 protein	672.44	171.57
-3.92	At5g64080	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein	757.92	193.25
-3.86	At1g74890	two-component responsive regulator / response regulator 15 (ARR15)	400.37	103.62
-3.85	At1g66160	U-box domain-containing protein	281.06	72.91
-3.85	At2g28790	osmotin-like protein, putative	707.8	183.71
-3.84	At5g50915	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein	975.74	254.28
-3.81	At3g56070	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative / cyclophilin, putative / rotamase, putative	695.1	182.44
-3.79	At5g25190	ethylene-responsive element-binding protein, putative	1463.77	386.17
-3.7	At2g25060	plastocyanin-like domain-containing protein	577.29	156
-3.68	At1g02200	CER1 protein	1675.49	455.48
-3.67	At4g23800	high mobility group (HMG1/2) family protein	262.23	71.44
-3.6	At4g10450	60S ribosomal protein L9 (RPL90D)	2090	581.25
-3.57	At4g12600	ribosomal protein L7Ae/L30e/S12e/Gadd45 family protein	993.45	278.28
-3.55	At5g22880	histone H2B like protein (emb CAA69025.1)	589.07	166
-3.55	At1g69040	ACT domain containing protein (ACR4)	798.18	224.99
-3.55	At2g05990	enoyl-(acyl-carrier protein) reductase (NADH), chloroplast, putative	1400.14	394.37
-3.54	At3g59350	serine/threonine protein kinase, putative	305.53	86.37
-3.52	At5g54970	expressed protein	487.73	138.48

-3.51	At5g20630	germin-like protein (GER3)	5032.36	1433.88
-3.5	At3g46940	deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase family	491.86	140.33
-3.49	At5g62720	integral membrane HPP family protein	994.35	284.84
-3.45	At2g21790	ribonucleoside-diphosphate reductase small chain, putative	473.28	137.33
-3.44	At1g19380	expressed protein	1526.68	444.17
-3.44	At4g18970	GDSL-motif lipase/hydrolase family protein	1845.32	536.46
-3.39	At3g54400	aspartyl protease family protein	1299.14	382.79
-3.37	At1g24020	Bet v I allergen family protein	3187.51	946.2
-3.33	At1g09200	histone H3	915.69	275.25
-3.32	At4g26230	60S ribosomal protein L31 (RPL31B)	1955.95	589.47
-3.32	At5g59870	histone H2A, putative	2034.25	612.44
-3.31	At4g17390	60S ribosomal protein L15 (RPL15B)	3582.78	1082.15
-3.3	At3g12110	actin 11 (ACT11)	995.61	302.12
-3.28	At5g65010	asparagine synthetase 2 (ASN2)	2669.66	813.73
-3.23	At5g15350	plastocyanin-like domain-containing protein	3124.31	966.74
-3.22	At1g31860	histidine biosynthesis bifunctional protein (HISIE)	597.17	185.45
-3.22	At1g02205	CER1 protein	2222	689.15
-3.18	At5g61170	40S ribosomal protein S19 (RPS19C)	2966.86	932.86
-3.18	At4g31700	40S ribosomal protein S6 (RPS6A)	3780.25	1187.76
-3.18	At5g57560	xyloglucan:xyloglucosyl transferase / xyloglucan endotransglycosylase	5709.42	1792.64
-3.17	At1g74670	gibberellin-responsive protein, putative	2725.76	860.73
-3.08	At5g10400	histone H3	1192.81	387.87

Tabelle 3.43. Änderung der Expression in *atnap6*.

Erste Spalte: Änderung der Expression gegenüber Wildtyp. Dritte Spalte: Annotierung aus Affymetrix *Arabidopsis*-Datenbank (<https://www.affymetrix.com/analysis/netaffx/index.affx>), Stand: April 2005. Spalte 4 und 5: Normalisierte Expressionsdaten nach Auswertung mit dChip. Nicht berücksichtigt wurden Gene mit Expressionswerten unterhalb von 250 in WT und *atnap6*.

3.5.2 Vergleich der Genexpression von *atnap6* in funktionellen Kategorien

Zusätzliche Aussagekraft besitzt die Betrachtung der Genexpression von *atnap6* im Vergleich zu Wildtyp im Zusammenhang von einzelnen Stoffwechselwegen und funktionellen Kategorien. Mit dem Computerprogramm MapMan (Thimm et al., 2004; <http://gabi.rzpd.de/projects/MapMan/>) wurden die aus dChip normalisierten Expressionsdaten in funktionelle Kategorien eingeordnet und die Expressionsmuster visualisiert. Alle Gene, deren absolute Expressionswerte unterhalb von 250 in WT und *atnap6* lagen, wurden aus der Analyse ausgeschlossen (siehe Kapitel 3.5.1).

3.5.2.1 Vergleich der *atnap6* Genexpression im allgemeinen Stoffwechsel

In Abbildung 3.44 ist die Veränderung der Expression anhand einer Stoffwechsel-Übersichtskarte von *Arabidopsis* dargestellt. Die einzelnen Gene sind durch kleine Quadrate symbolisiert. Je nach Änderung der Expression änderte sich die ursprünglich weiße Einfärbung bei einer Erhöhung in blaue Farbtöne, bei einer Verringerung in rote Farbtöne. Hierbei entspricht die Intensität der Farbe dem Ausmaß der Änderung. Weiße Quadrate zeigen unveränderte Expression an. Für die Stoffwechsel-Übersicht wurden die log2-Werte der Änderung von *atnap6* zu WT als Datensatz verwendet. Die Verwendung logarithmischer Daten hebt die Gene mit der höchsten relativen Änderung besonders hervor.

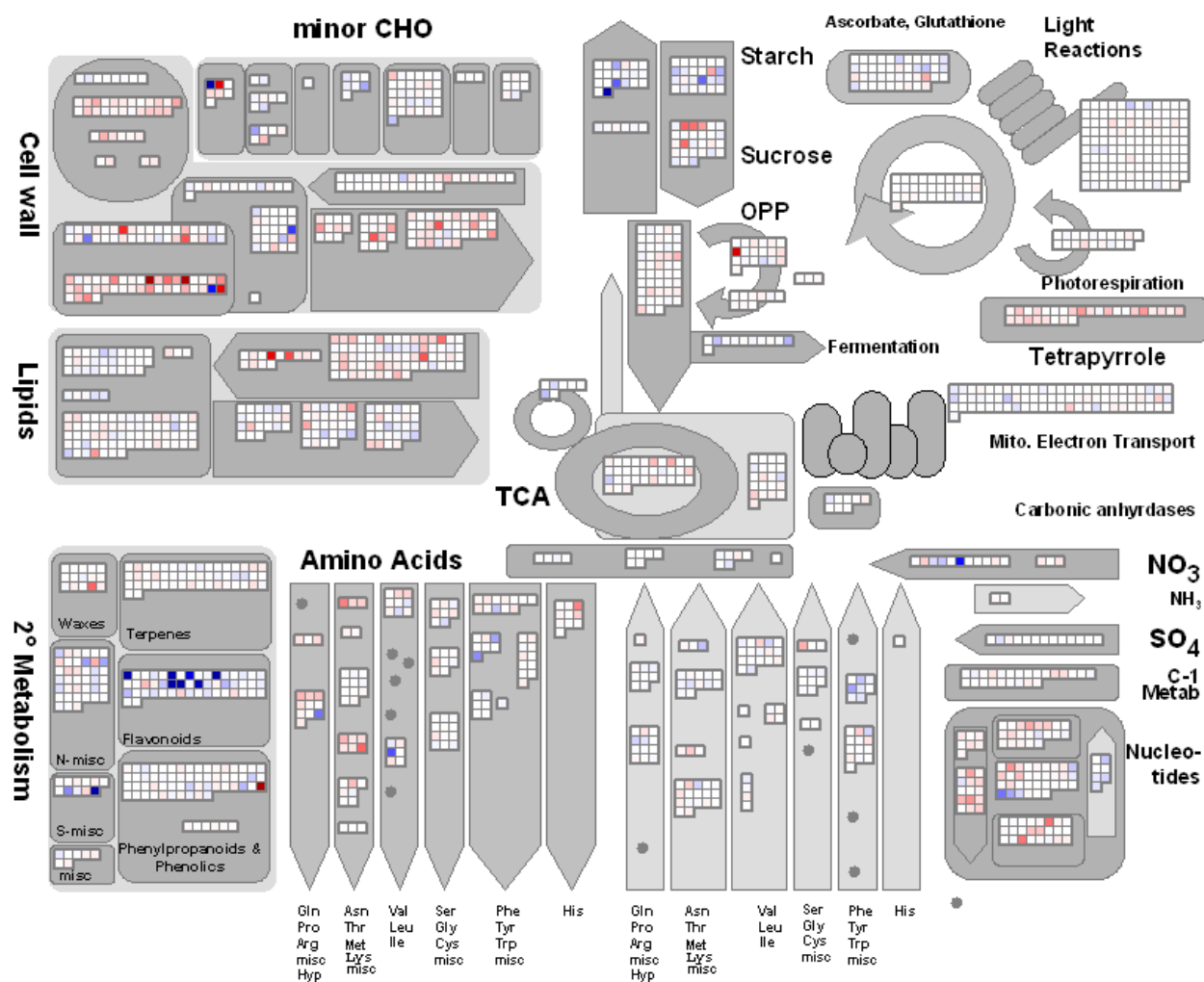


Abbildung 3.44. Änderung der Expression im Stoffwechsel von *atnap6*: Übersicht.

Abbildung generiert mit MapMan, Expressionsdaten wurden als log2-Werte der Änderung von *atnap6* zu WT aus dChip importiert. Die Zuordnung der Gene zu den Kategorien erfolgte nach der aktuellen TAIR-Datenbank.

Die Übersicht über den Stoffwechsel erlaubte zunächst, die hauptsächlich betroffenen Stoffwechselwege der *atnap6* Mutation zu bestimmen. Hierzu zählte die Flavonoid-Biosynthese mit einer Anzahl stark hochregulierter Gene. Weiterhin waren die mRNA-Mengen mehrerer Gene stark verringert, deren Proteine eine Funktion bei der Modifikation der Zellwand besitzen. Im Lipidstoffwechsel waren zwei Fettsäure-Desaturasen durch stark reduzierte Expression gekennzeichnet. Der Tetrapyrrol-Biosyntheseweg zeigte eine erkennbare Reduzierung der Expression von Schlüsselenzymen, während die Photosynthese-Gene (siehe Abbildung 3.45) weitgehend unverändert exprimiert wurden. Detailliertere Analysen werden im Folgenden anhand einzelner Kartierungen dargestellt.

3.5.2.2 Vergleich der *atnap6* Genexpression im Photosynthese-System

Um auch geringere Änderungen der Expression hervorzuheben, wurden die Änderungen der Photosynthesegene anhand der relativen Änderung dargestellt (Abbildung 3.45). Es ist erkennbar, dass eine größere Änderung nur bei wenigen Genen zu messen war. In Tabelle 3.46 sind die betroffenen Gene aufgelistet.

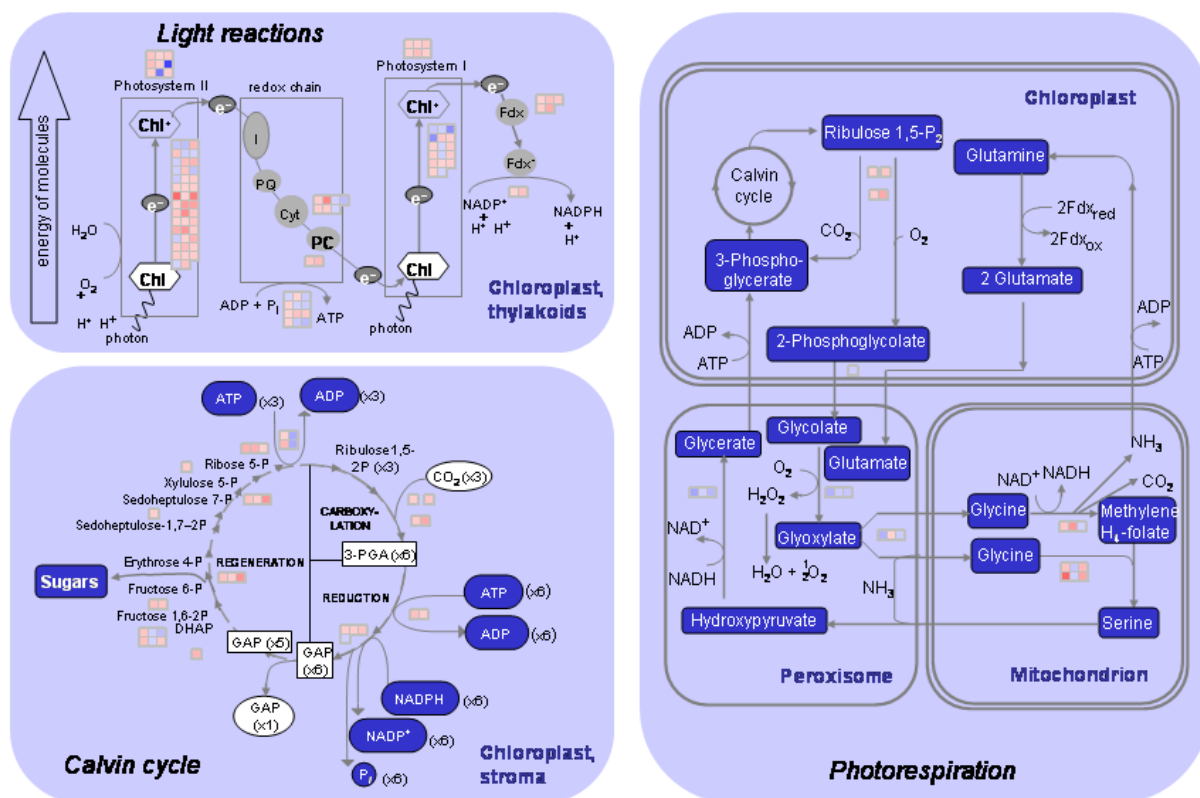


Abbildung 3.45. Änderung der Expression von Photosynthesegenen in *atnap6*.

Relative Änderung der Expression von *atnap6* zu WT. Blau: Erhöhung in *atnap6*; Rot: Verringerung in *atnap6*.

Photosystem II

2.09	At1g76570	Chlorophyll A-B binding protein
1.76	At2g40100	LHCB4.3 Chlorophyll A-B binding protein
-1.85	At4g15510	PsbP Photosystem II reaction centre protein
-1.71	At5g11450	Photosystem II water-oxidizing complex protein
-1.61	At4g28660	PsbW Photosystem II reaction centre protein

Redox-Kette

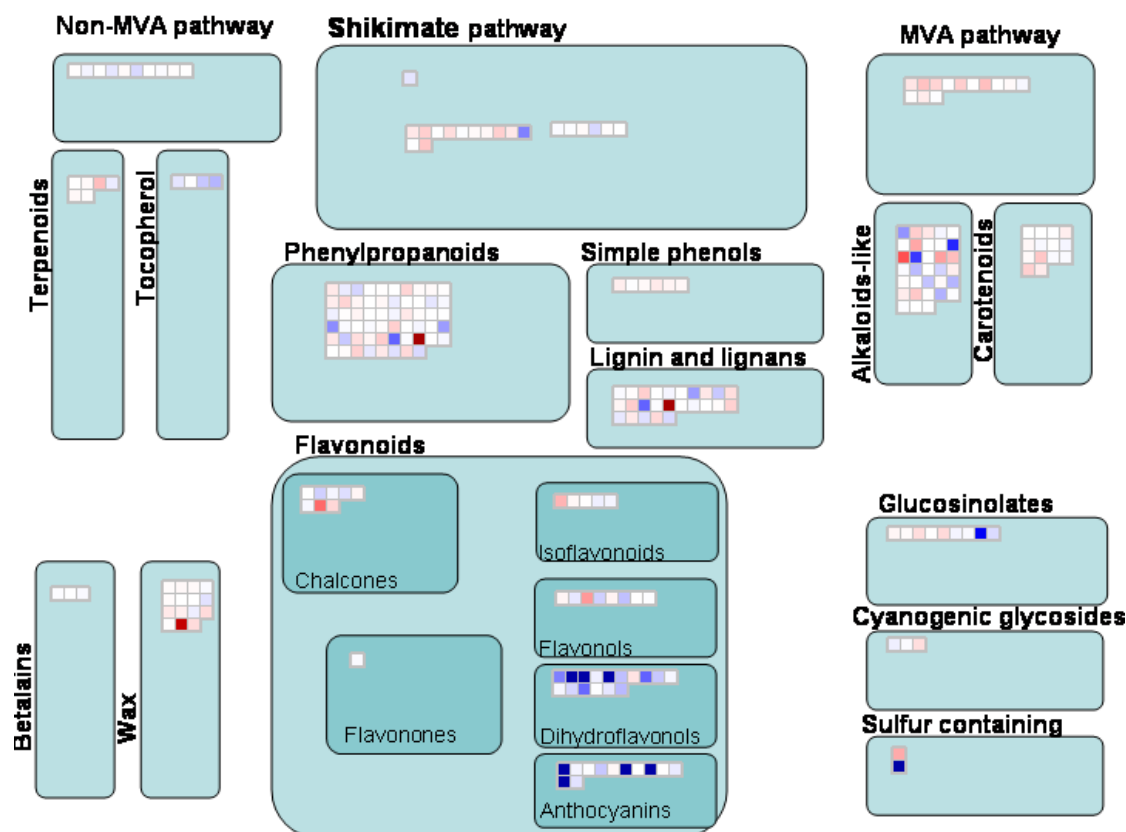
-1.65	AtCg00600	Cytochrome b6-f complex subunit V, petG
-------	-----------	---

Photosystem I

1.6	AtCg00340	Photosystem I P700 apoprotein A2, psaB
1.59	AtCg00350	Photosystem I P700 apoprotein A1, psaA

Tabelle 3.46. Änderung der Expression von Photosynthese-Genen.

Erste Spalte: Faktor der Änderung der Expression gegenüber Wildtyp. Zweite und dritte Spalte: Name und Beschreibung der Genprodukte.

3.5.2.3 Vergleich der *atnap6* Genexpression im Sekundären Metabolismus**Abbildung 3.47. Änderung der Expression von Genen des Sekundären Stoffwechsels.**

Expressionsdaten wurden als log2-Werte der Änderung von *atnap6* zu WT dargestellt.

Wie bereits in der Übersichtskarte des Stoffwechsels erkennbar, zeigten sich mehrere signifikante Änderungen bei Enzymen der Flavonoid-Biosynthese (Abbildung 3.47). Betroffen ist die Synthese von Anthocyanin und Dihydroflavonol, verschiedene Enzyme dieser Synthesewege zeigten deutlich erhöhte Transkriptmengen.

Einzelne weitere Gene mit signifikant veränderter Expression sind in Tabelle 3.48 aufgeführt.

Anthocyanin		
51.37	At4g22880	Leucoanthocyanidin dioxygenase
37.45	At1g03940	Anthocyanin 5-aromatic acyltransferase
22.86	At1g56650	Anthocyanin 2
6.17	At3g29590	Anthocyanin 5-aromatic acyltransferase
1.69	At5g39050	Anthocyanin 5-aromatic acyltransferase
Dihydroflavonol		
54.76	At5g54060	Flavonol 3-O-glucosyltransferase
47.85	At5g42800	Dihydroflavonol 4-reductase
7.31	At5g07990	Flavonoid 3-hydroxylase
2.4	At4g12300	Flavonoid 3,5-hydroxylase
2.36	At1g01420	Flavonol 3-O-glucosyltransferase
2.21	At5g17050	UDP glucose:flavonoid 3-O-glucosyltransferase
1.8	At2g29740	Flavonol 3-O-glucosyltransferase
1.75	At3g51240	Flavanone 3-hydroxylase FH3
Lignin / Lignan		
2.41	At3g61990	O-methyltransferase family 3 protein
2.01	At3g21230	4-coumarate:CoA ligase 2
-8.87	At1g67990	S-adenosyl-L-methionine:trans-caffeoyl-Coenzyme A 3-O-methyltransferase
Wachs		
-3.68	At1g02205	CER1 protein, octadecanal decarbonylase
Schwefel-haltig		
13.53	At1g34060	Alliinase
3.14	At1g52000	Myrosinase binding protein

Tabelle 3.48. Änderungen der Genexpression im Sekundären Stoffwechsel.

Erste Spalte: Faktor der Änderung der Expression gegenüber Wildtyp. Zweite und dritte Spalte: Name und Beschreibung der Genprodukte.

3.5.2.4 Vergleich der *atnap6* Genexpression von regulativen Genen

Die Betrachtung der Expression von regulativen Genen wurde durchgeführt, um Hinweise auf regulative Prozesse der *atnap6* Mutante zu erhalten, die für die beobachteten Phänotypen verantwortlich sein könnten.

Auffällig waren Änderungen in der Expression verschiedener Response-Regulatoren (ARRs) und eines Histidin Phosphotransfer-Proteins (AHP4) des Cytokinin Signalwegs (Abbildung 3.49).

Zusätzlich waren zahlreiche Glutaredoxine in *atnap6* deutlich verändert exprimiert, 6 Glutaredoxine waren in der Expression reduziert, während 3 weitere eine Erhöhung der Expression aufwiesen.

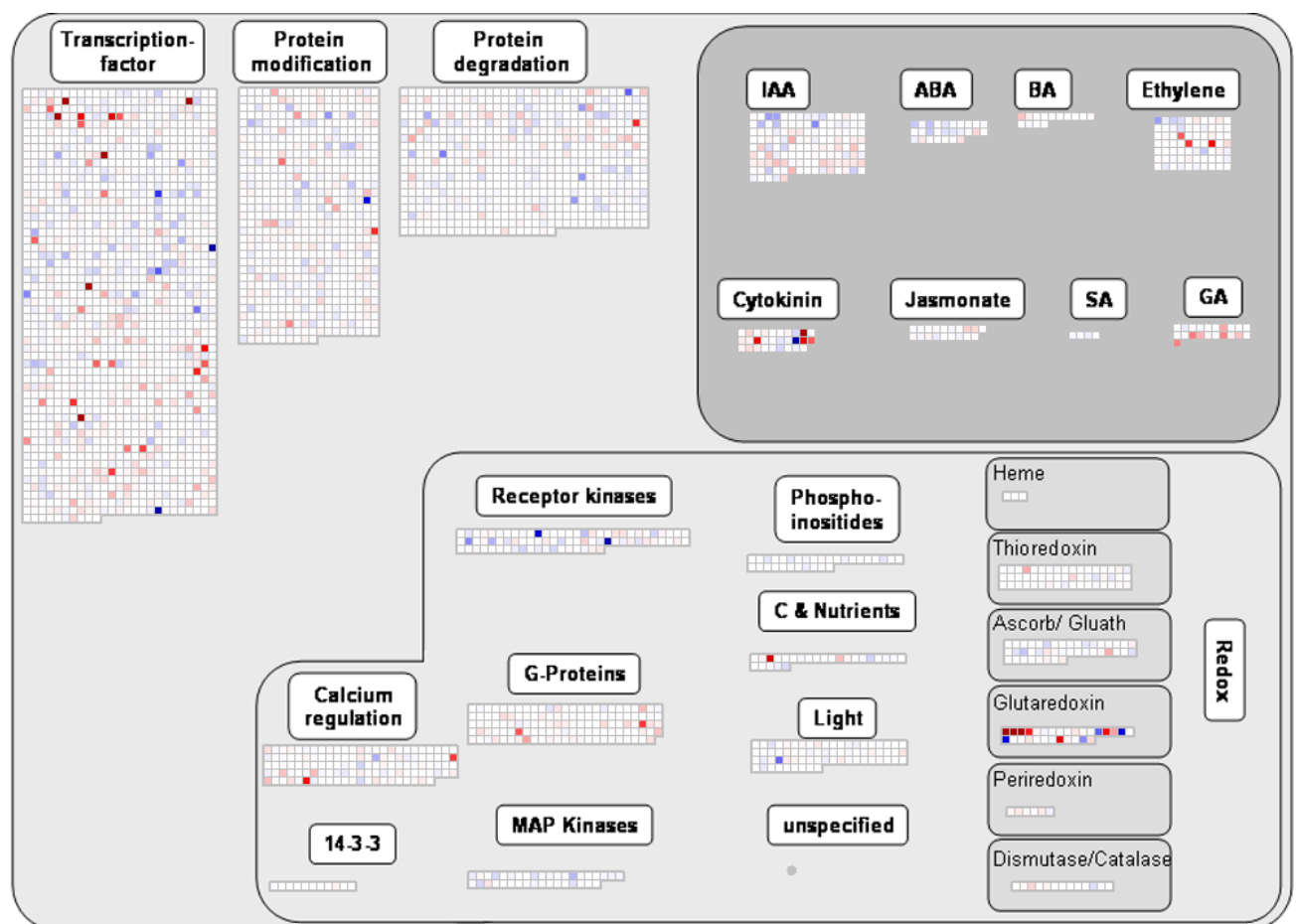


Abbildung 3.49. Änderung der Expression von regulativen Genen in *atnap6*.

Expressionsdaten wurden als log2-Werte der Änderung von *atnap6* zu WT dargestellt.

Mehrere AP2-Transkriptionsfaktoren waren reduziert, stark erhöht war die Expression eines Myb-Transkriptionsfaktors zur Synthese von Anthocyanin 2.

Weiterhin war ein Chlorophyll A-B-bindendes Protein der ELIP („early light induced protein“)-Familie in der Expression deutlich erhöht. Weitere deutlich unterschiedlich exprimierte Gene sind in Tabelle 3.50 aufgelistet.

Cytokinin		
-12.07	At5g62920	ARR6 Response Regulator Type A
-6.08	At1g19050	ARR7 Responses Regulator Type A
-5.73	At3g48100	ARR5 Response Regulator Type A
-3.86	At1g74890	ARR15 Response Regulator Type A
7.92	At3g16360	AHP4 Histidine phosphotransfer protein
Licht		
3.67	At3g22840	ELIP Chlorophyll A-B binding protein
Glutaredoxin		
-13.64	At4g15690	Glutaredoxin
-13.59	At4g15680	Glutaredoxin
-9.95	At4g15660	Glutaredoxin
-6.12	At1g03020	Glutaredoxin
-5.25	At3g62930	Glutaredoxin
-4.97	At4g15700	Glutaredoxin
-2.79	At3g62950	Glutaredoxin
6.34	At3g62960	Glutaredoxin
6.16	At4g33040	Glutaredoxin
3.77	At5g11930	Glutaredoxin
3.11	At2g47880	Glutaredoxin
Transkriptionsfaktoren		
-19.3	At4g29030	Glycine-rich protein
-16.49	At3g48360	Speckle-type POZ protein
-14.63	At5g44160	C2H2 Zinc-finger protein
-8.88	At4g23750	AP2 domain protein, Ethylene-responsive element binding
-8.1	At1g21910	AP2 domain protein, Ethylene-responsive element binding
33.07	At1g66390	Myb Transcription factor PAP2
Sonstige		
-6.73	At1g35140	Phosphate-responsive protein

-5.29	At1g62480	Vacuolar calcium-binding protein
-4.37	At4g31000	Calmodulin-binding protein
6.63	At5g59700	Receptor-like protein kinase

Tabelle 3.50. Änderung der Expression von regulativen Genen in *atnap6*.

Erste Spalte: Faktor der Änderung der Expression gegenüber Wildtyp. Zweite und dritte Spalte: Name und Beschreibung der Genprodukte.

3.5.2.5 Vergleich der *atnap6* Expression von Genen der zellulären Stressantwort und Entwicklung

Die globale Veränderung der Gene der Stressantwort und zellulären Entwicklung ist in Abbildung 3.51 dargestellt. Verschiedene Stress-abhängige Gene lagen in *atnap6* mit veränderter Expression vor. Diese sind in Tabelle 3.52 zusammengefasst mit den an der Zellentwicklung beteiligten Genen aufgeführt.

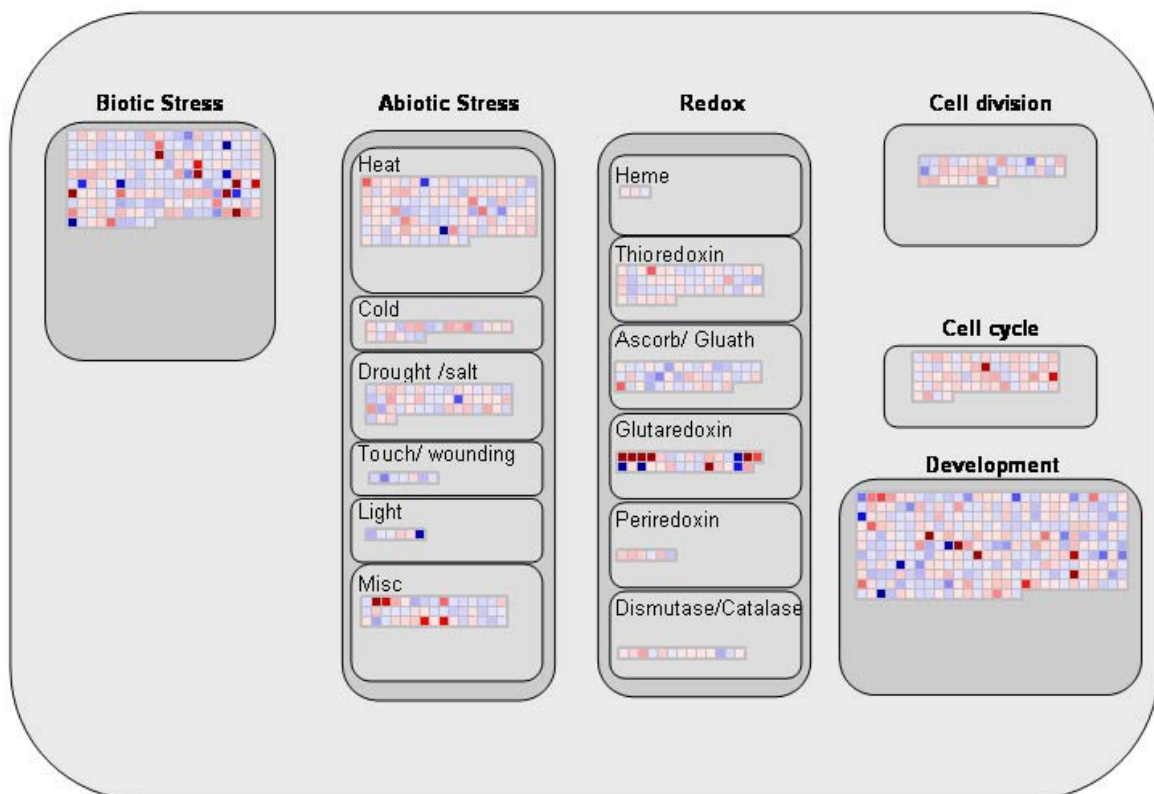


Abbildung 3.51. Änderung der Expression von Genen der zellulären Stressantwort und Entwicklung.

Dargestellt ist die relative Änderung von *atnap6* zu WT.

Biotischer Stress

-8.87	At1g67990	S-adenosyl-L-methionine:trans-caffeoyl-Coenzyme A 3-O-methyltransferase
-6.29	At2g02100	Plant defensin protein PDF2.2
-5.4	At1g18250	Thaumatococcus
-4.71	At2g43590	Chitinase
-4.52	At1g61070	Plant defensin protein PDF2.4
-4.04	At5g36910	Thionin
6.42	At2g14610	Pathogenesis related protein PR-1
5.83	At5g44420	Antifungal protein AFP4

Abiotischer Stress

-22.09	At1g28290	Pollen Ole e1 allergen and extensin
-3.51	At5g20630	Germin-like protein GER3
-3.24	At1g70830	Bet v I allergen
-3.37	At1g24020	Bet v I allergen
4.47	At2g40130	Heat shock protein HSP101
2.95	At4g36990	Heat shock transcription factor 4 HSTF4
2.69	At1g69450	Early-response to dehydration protein

Redox

-2.62	At5g61440	Thioredoxin
-2.57	At1g63940	Monodehydroascorbate reductase

Zellzyklus

-3.81	At3g56070	Cyclophilin
-3.53	At1g47210	Cyclin

Entwicklung

-5.17	At1g19200	Senescence-associated protein
-4.78	At4g34950	Nodulin-like protein
-4.5	At3g15400	Anther development protein
-4.49	At1g75910	Extracellular lipase EXL4
-3.76	At1g69120	floral homeotic protein APETALA1
10.85	At2g41380	Embryo-abundant protein
3.89	At1g52880	NAM family protein
3.81	At1g22160	Senescence-associated protein
3.17	At5g50800	Nodulin MtN3 family protein

Tabelle 3.52. Änderung der Expression von Genen der zellulären Stressantwort und Entwicklung.

Erste Spalte: Faktor der Änderung der Expression von *atnap6* im Vergleich zu Wildtyp. Zweite und dritte Spalte: Name und Beschreibung der Genprodukte.

3.5.2.6 Expression der *atnap6* Tetrapyrrolsynthese-Enzyme

Für die *sufB* Mutante *atnap1* (Møller et al., 2001) wurde eine Akkumulation von Protoporphyrin IX, einem Zwischenprodukt in der Tetrapyrrolsynthese, nachgewiesen. Um eine Beeinträchtigung des Tetrapyrrol-Wegs in *atnap6* zu untersuchen, wurde die Expression der entsprechenden Gene analysiert. Aus Abbildung 3.45 geht hervor, dass eine allgemeine Reduzierung der Expression vorlag. Die detaillierten Änderungen der Expression sind in Tabelle 3.53 aufgeführt.

Tetrapyrrolsynthese

-2.91	At4g27440	PORB Protochlorophyllide reductase B
-2.87	At5g54190	PORA Protochlorophyllide reductase A
-2.35	At5g40850	UPM1 Uroporphyrin III methylase
-2.24	At3g14930	UPD Uroporphyrinogen decarboxylase
-2.21	At5g08280	Porphobilinogen deaminase
-2.08	At5g63570	GSA1 Glutamate-1-semialdehyde aminomutase
-2.04	At2g40490	UPD Uroporphyrinogen decarboxylase
-1.91	At5g26710	Glutamate-tRNA ligase
-1.74	At5g45930	Mg-protoporphyrin IX chelatase
-1.82	At1g69740	Porphobilinogen synthase
-1.77	At1g08520	Mg-protoporphyrin IX chelatase CHLD
-1.84	At4g18480	Mg-protoporphyrin IX chelatase CHLI
-1.54	At1g03475	Coproporphyrinogenase
1.36	At5g43860	Chlorophyllase CLH2

Tabelle 3.53. Änderung der Genexpression für Enzyme der Tetrapyrrolsynthese.

Erste Spalte: Faktor der Änderung der Expression von *atnap6* im Vergleich zu Wildtyp. Zweite und dritte Spalte: Name und Beschreibung der Genprodukte.

Die Gene für die Tetrapyrrolsynthese waren durchgängig in der Expression gegenüber dem Wildtyp reduziert. Die stärkste Reduzierung betraf die Gene des einzigen lichtabhängigen Schritts der Chlorophyllbiosynthese, PORA und PORB. Die übrigen Gene waren ebenfalls deutlich im Vergleich zum Wildtypniveau reduziert. Eine leichte Erhöhung war nur bei der Chlorophyllase CLH2, einem Chlorophyll-abbauendem Enzym zu beobachten.

3.5.2.7 Expression der *suf*-Gene *sufA* bis *sufE* in *atnap6*

Die Änderungen in der Expression der *suf*-Gene konnten durch die Microarray-Daten verifiziert werden (Abbildung 3.54).

Erwartungsgemäß war die Expression von *sufD* stark reduziert, der absolute Meßwert für die Expression von *sufD* lag in der Nähe des Grenzwertes, bei dem nicht mehr von einem exprimierten Gen ausgegangen wurde („absent call“). Somit bestätigte sich die Knock-out Mutation von *sufD* in der *atnap6* Mutante. Die übrigen *suf*-Gene zeigten keine einheitliche Veränderung der Expression. Während das Expressionsniveau von *sufS* dem des Wildtyps entsprach, war die Expression von *sufA* und *sufB* in *atnap6* erhöht, die Expression von *sufC* und *sufE* hingegen verringert.

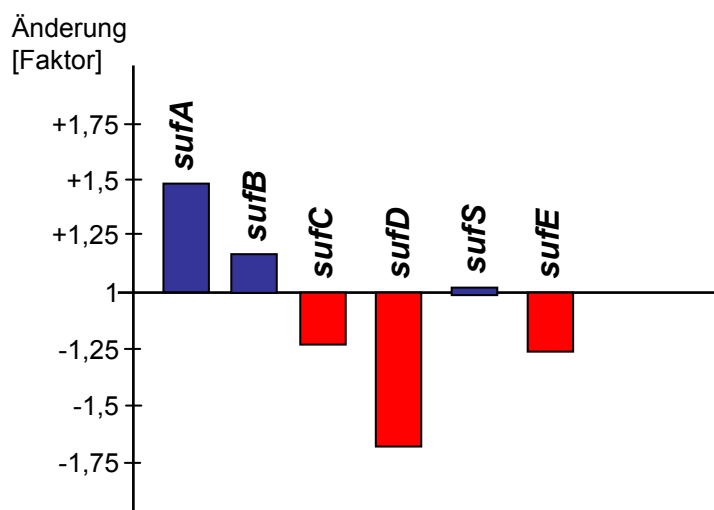


Abbildung 3.54. Änderung der Expression der SUF-Komponenten in *atnap6*.

Auswertung der Microarray-Daten von *atnap6* im Vergleich zu WT. Erwartungsgemäß ist *sufD* stark reduziert, der gemessene absolute Fluoreszenzwert liegt in der Nähe des Grenzwerts von nicht exprimierten Genen.

3.5.3 Zusammenfassung der Microarray-Analyse von *atnap6*

Durch die Analyse der Genexpression von *atnap6* konnten wichtige Hinweise auf die von der *sufD* Mutation betroffenen Stoffwechsel- und Signalwege der Pflanze erhalten werden. Die hauptsächlichsten Änderungen betrafen relativ wenige distinkte funktionelle Bereiche. So wurde die Anthocyanin und Flavonoid-Biosynthese in der Mutante induziert, verschiedene Zellwand-modifizierende Enzyme hingegen reduziert. Die Tetrapyrrol-Biosynthese wurde global reduziert,

die Photosynthese war in einigen wenigen Komponenten betroffen. Zahlreiche Glutaredoxine zeigten ein deutlich verändertes Expressionsmuster. Eine wichtige Änderung war in der Cytokinin-Signlisierung zu beobachten, der Transkriptionsfaktor ARR6, ein Schlüsselenzym der Signalübertragung, war deutlich reprimiert, zusammen mit weiteren Response-Regulatoren vom Typ A.

Die Auswertung der Microarray-Daten erlaubt somit eine Diskussion der beobachteten Phänotypen von *atnap6* vor dem Hintergrund einer veränderten Genexpression im zellulären Kontext.

4 Diskussion

4.1 ORF467 in *Guillardia theta*

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Nucleomorph-kodierte Protein ORF467 der Cryptomonade *Guillardia theta* in der Plastide lokalisiert ist. Die Aminosäuresequenz von ORF467 weist Homologien zu SufD, einem Protein mit Homologen in Bakterien und Pflanzen auf (Kapitel 3.1.1) und enthält eine N-terminale Extension als topogenes Signal zum Import des Präproteins in die Plastide. Die plastidäre Lokalisation von ORF467 aus *Guillardia theta* konnte durch immunologische Methoden eindeutig nachgewiesen werden.

4.1.1 Cryptomonaden besitzen ein plastidär lokalisiertes SUF-System

Durch die Sequenzierung des Nucleomorph- und Plastidengenoms (Douglas et al., 2001; Douglas und Penny, 1999) von *Guillardia theta* wurde erkennbar, dass Cryptomonaden die Gene für mehrere SUF-Proteine besitzen. Anhand der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Cryptomonade *Guillardia theta* neben den im Plastidengenom lokalisierten Genen für *sufB* (*ycf24*) und *sufC* (*ycf16*) ein Gen für SufD (*orf467*) im Genom des Nucleomorphs enthält. Weiterhin konnte ein *sufS*-Gen im Kerngenom nachgewiesen werden.

Das SUF-System (SUF: Mobilization of Sulfur = Mobilisierung von Schwefel) ist für die Instandhaltung und Synthese von Eisen-Schwefel (Fe-S) Clustern unter Bedingungen von oxidativem Stress und Eisenmangel erforderlich (Outten et al., 2004). Das SUF-System kommt in Bakterien und Pflanzen vor. Ähnlich wie das mitochondrielle ISC-System (Lill und Kispal, 2000) zur Synthese von Fe-S Clustern besteht auch das SUF-System aus mehreren Komponenten.

Die Zusammensetzung des SUF-Systems variiert je nach Organismus. Das Genom von *E. coli* enthält die *suf*-Gene in Form eines kompletten *sufABCDSE* Operons, Cyanobakterien enthalten ein Operon aus *sufBCDS*. Während das Auftreten von *sufA*, *sufE* und dem bislang nur für Cyanobakterien beschriebenen regulatorischen *sufR* (Wang et al., 2004) je nach Spezies variiert, ist *sufC* immer zusammen mit *sufB* und/oder *sufD* vorhanden. In den Plastidengenomen von

Rotalgen und Cryptomonaden sind *sufB* und *sufC* als benachbarte Gene enthalten. In Rotalgen ist *sufD* im Kern lokalisiert, während die Cryptomonaden *sufD* im Genom des Nucleomorphs enthalten (Tabelle 4.1).

Die Homologien der eukaryoten SUF-Proteine zu den bakteriellen SUF-Proteinen, im Fall von *Guillardia theta* insbesondere zu den cyanobakteriellen SUF-Proteinen, deutet auf eine Aufnahme des ursprünglich prokaryoten SUF-Systems durch Endosymbiose hin. Während der primären Endosymbiose, die zur Entstehung unter anderem der Rotalgen führte, wurden die *suf*-Gene mit dem photosynthetisch aktiven bakteriellen Endosymbionten aufgenommen. Mit der Reduktion des Endosymbionten zum Organell wurden die *suf*-Gene auf den Zellkern transferiert. Die Gene *sufB* und *sufC* verblieben in Rotalgen und Cryptomonaden im Plastidengenom, wie durch die Sequenzierung der Plastidengenome von *Guillardia theta* (Douglas und Penny, 1999) und *Cyanidioschyzon merolae* (Ohta et al., 2003) nachgewiesen werden konnte.

	<i>sufA</i>	<i>sufB</i>	<i>sufC</i>	<i>sufD</i>	<i>sufS</i>	<i>sufE</i>	<i>sufR</i>
<i>Guillardia theta</i>		ycf24	ycf16	orf467	gt19a11		
<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	cmf122c	cmv001c	cmv002c	cmh006c	cmh014c	cms131c	
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	sc.74 77030	sc.118 14489	sc.118 15955	sc.15 199166	sc.72 39340	sc.87 62547	
<i>Arabidopsis thaliana</i>	at1g10500	at4g04770 at5g44316	at3g10670	at1g32500	at1g08490	at4g26500	
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	C_190079	C_7720002 C_1240001	C_420004	C_160126	C_3680001	C_90207	
<i>Bigeloviella natans</i>	?	EST	EST	?	?	EST	
<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	slr1417	slr0074	slr0075	slr0076	slr0077	slr1419	slr0088
<i>Escherichia coli</i> K-12	ydiC	ynhE	ynhD	ynhc	csdB	ynha	

Tabelle 4.1. *suf*-Gene in verschiedenen Organismen.

Identifizierte Homologe von *suf*-Genen in verschiedenen Organismen. Farbiger Hintergrund zeigt Lokalisierung der Gene in den verschiedenen Genomen der jeweiligen Organismen, Grün: Plastide, Gelb: Nucleomorph, Orange: Kern. EST-Daten für *Bigeloviella* aus Archibald et al., 2004.

Von Nachin et al. (2001) und Rangachari et al. (2002) wurde gezeigt, dass SufC ATPase-Aktivität besitzt. Zusätzlich konnten Nachin et al. (2003) und Xu und Møller (2004) eine Interaktion mit SufB und SufD in *Erwinia chrysanthemi* bzw. *Arabidopsis thaliana* nachweisen. Diese Untersuchungen ließen vermuten, dass es sich bei SufB, SufC und SufD um die Bestandteile eines ABC-Transporters handeln könnte.

Der klassische ABC-Transporter ist aus mehreren Bestandteilen aufgebaut. Hierzu zählen zwei integrale Membrankomponenten, die aus α -helikalen Domänen bestehen und die eigentliche Transportpore bilden. Mit diesen interagieren die ABC-Domänen, die durch die Hydrolyse von ATP die benötigte Energie für den Transport über die Membran liefern. Die Verteilung dieser Domänen innerhalb der ABC-Transporterproteine variiert. In Bakterien sind häufig die Komponenten auf einzelne Proteine verteilt, während Eukaryoten auch Kombinationen der verschiedenen Domänen in ihren Transporterproteinen enthalten (Schneider und Hunke, 1998).

Im Allgemeinen können die Transmembrandomänen von Membranproteinen durch *in silico* Analysen zuverlässig bestimmt werden. Sollte es sich bei den Proteinen SufBCD um einen ABC-Transporter handeln, so wäre zumindest eine Transmembrandomäne bei einem der drei Proteine zu erwarten gewesen. Mit verschiedenen Computeralgorithmen wurden jedoch keine solchen Domänen für die SUF-Proteine von *Guillardia theta* vorhergesagt (Kapitel 3.1.5).

4.1.2 SufS – kernkodierte Komponente des SUF-Systems in Cryptomonaden

Durch das noch nicht abgeschlossene EST-Projekt von *Guillardia theta* bestand die Möglichkeit, die vorliegenden Sequenzdaten auf das Vorhandensein weiterer *suf*-Gene zu untersuchen.

In dieser Arbeit konnte ein Gen im Kerngenom von *Guillardia theta* identifiziert werden, das ein Protein mit hohen Homologien zu SufS aus höheren Pflanzen, Rotalgen und Bakterien (Kapitel 3.1.8) kodiert. Die identifizierte Sequenz von SufS aus *Guillardia theta* wies einen im Vergleich mit anderen SufS-Sequenzen verkürzten N-Terminus des Proteins auf. Somit besteht die Möglichkeit, dass der SufS EST-Klon *gt19a11* nicht die vollständige SufS-Sequenz kodiert. Das Vorhandensein einer N-terminalen Extension als topogenes Signal zum Import in die komplexe Plastide von *G. theta* konnte somit für SufS noch nicht bewiesen werden. Jedoch konnte durch die Identifizierung von *sufS* im Kerngenom von *Guillardia theta* zum ersten Mal gezeigt werden, dass ein plastidär lokalisiertes System über drei verschiedene Genome verteilt ist (Abbildung 4.2).

Diese ungewöhnliche Verteilung der *suf*-Gene über drei Genome in den Cryptomonaden entstand vermutlich in mehreren Schritten im Laufe der Evolution. Zunächst wurde das SUF-System in der primären Endosymbiose mit dem Cyanobakterium in den eukaryoten Wirt aufgenommen. Einige *suf*-Gene wurden während der nachfolgenden Reduktion des Cyanobakteriums zum Organell in das Kerngenom übertragen, die Gene *sufB* und *sufC* verblieben im Plastidengenom. Es entstand die für heutige Rotalgen (Matsuzaki et al., 2004) charakteristische genomische Verteilung des SUF-Systems mit *sufB* und *sufC* im Plastidengenom und *sufA*, *sufD*, *sufE* und *sufS* im Kerngenom.

Im Verlauf der sekundären Endosymbiose, die zur Entstehung der Cryptomonaden führte, wurde der Zellkern der aufgenommenen Rotalge durch Gentransfer auf den Kern des Wirts und Genverlust bis zum Nucleomorph reduziert. Auch zahlreiche ursprünglich cyanobakterielle Gene, die in der primären Endosymbiose in den Kern der Rotalge transferiert worden waren, wurden in das Kerngenom des eukaryoten Wirts übertragen. Die genomische Verteilung des SUF-Systems wurde hierbei erneut geändert, *sufS* wurde vom Kern des Endosymbionten in den Kern des Wirts übertragen, *sufD* hingegen verblieb auch nach der weitgehenden Reduktion des Rotalgenkerns bis zum Nucleomorph der Cryptomonaden in diesem Restgenom.

4.1.3 Die genomische Kompartimentalisierung des SUF-Systems in Cryptomonaden

Der Gentransfer der Sekundären Endosymbiose war also vorwiegend ein Transfer von eukaryotem Symbiontengenom zum Kerngenom des Wirts. Eine weitere Verlagerung der SUF-Komponenten *sufB* und *sufC* von der Plastide in das Kerngenom von *Guillardia theta* und *Talassiosira pseudonana* fand nicht statt. Dies deutet auf eine potentielle Schwierigkeit hin, die Gene für ein essentielles biochemisches System aus zwei unterschiedlichen Genomen, Plastidengenom und Kerngenom des Endosymbionten, in den Kern des zu überführen.

Voraussetzung für einen solchen Transfer ist das Vorhandensein eines Transportsystems, das die neuen kernkodierte Proteine in die ursprünglichen Kompartimente der Zelle zurück dirigieren kann. Ein Gentransfer von Komponenten plastidärer Systeme erfordert dementsprechend ein Transportsystem in die Plastide. Zusätzlich muss das Transportsystem so gestaltet sein, dass Proteine für das periplasmatische Kompartiment, das frühere Cytosol der Rotalge, nach dem Transfer der kodierenden Gene vom Endosymbiontenkern in dieses zurück gelangen können, sofern nicht die Relokalisation der biochemischen Funktion in das Cytosol einen Transport erübrigt.

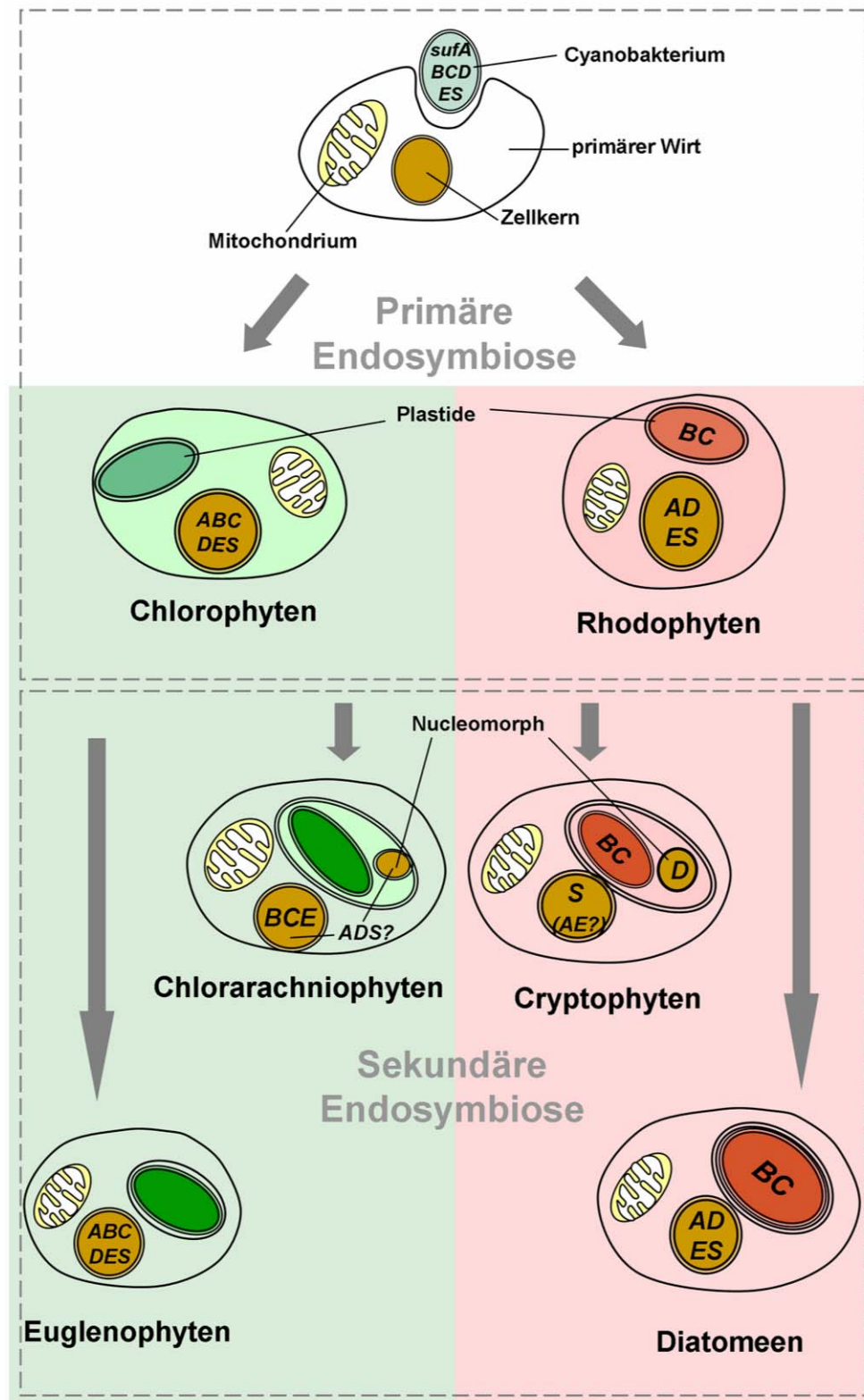


Abbildung 4.2. Kompartimentalisierung der *suf*-Gene in verschiedenen Organismen.

Schematische Darstellung der Verteilung des *SUF*-Systems in verschiedenen Organismen. A-S: Gene *sufA-sufS*. Cyanobakterium: *Synechocystis* sp. PCC6803, Rhodophyten: *Cyanidioschyzon merolae*, Chlorophyten: *Chlamydomonas reinhardtii*, Cryptophyten: *Guillardia theta*, Chlorarachniophyten: *Bigeloviella natans*, Diatomeen: *Thalassiosira pseudonana*, Euglenophyten: *Euglena gracilis*.

Das SUF-System selbst kann offensichtlich durchaus vollständig aus dem Plastidengenom in den Kern verlagert werden, wie das Beispiel der höheren Pflanzen zeigt. Die SUF-Proteine ATNAP1 (SufB), ATNAP7 (SufC) und ATNAP6 (SufD) von *Arabidopsis thaliana* sind kernkodiert und werden in die Plastide importiert (Xu et al., 2005; Xu und Möller, 2004; Hjorth et al., 2005). Die SUF-Proteine SufA, SufE und SufS aus *Arabidopsis thaliana* besitzen ein Transitpeptid und sind vermutlich ebenfalls plastidär lokalisiert. Ein Verbleib einzelner *suf*-Gene im Plastidengenom, wie in Rotalgen und Cryptomonaden, ist demnach nicht funktionell begründet. Die Beteiligung des SUF-Systems an der Biosynthese von plastidären Eisen-Schwefel-Cluster Proteinen erlaubt keine Relokalisierung des Systems in das Cytosol. Der Transport von assemblierten Fe-S Proteinen über Membranen ist nur schwer möglich und erfordert den Einbau der Fe-S Cluster vor Ort, sowohl in Mitochondrien als auch in Plastiden. Die Proteine des plastidären SUF-Systems können jedoch in beliebigen Genomen kodiert sein, sofern die Aminosäuresequenzen die erforderlichen topogenen Signale zum Import in die Plastide enthalten.

Die Cryptomonaden stellen in evolutionärer Hinsicht somit eine Zwischenstufe in der Reduktion des Symbionten dar. Die erforderlichen Mutationen, vermutlich durch Rekombination (Kilian und Kroth, 2004), der *suf*-Gene zur Modifikation der kodierten Proteine mit einem geeigneten topogenen Signal zum Reimport in die Plastide erfolgten in den Cryptomonaden nicht.

Folglich besteht in den Cryptomonaden auch weiterhin der Bedarf, einen Nucleomorph mit allen erforderlichen Genen einer Expressionsmaschinerie für die verbliebenen Proteine mit plastidären Funktionen zu erhalten. Erst nach Verlagerung des letzten Gens für plastidäre Funktionen auf das Kerngenom entfällt die essentielle Rolle des Nucleomorphs. Ebenso wird die Bedeutung des periplasmatischen Kompartiments, in Cryptomonaden ist dies unter anderem der Ort der Stärke-Speicherung, mit der Verlagerung der verbliebenen biochemischen Funktionen in das Cytosol abnehmen. Die Heterokontophyten sind ein Beispiel für diese schrittweisen Verlagerungen, die Stärke wird hier bereits im Cytosol gespeichert und es ist kein Nucleomorph mehr vorhanden. Es verbleiben vier Membranen um die Plastide und somit auch ein Rest des periplasmatischen Kompartiments. Möglich ist, dass eine Verlagerung der letzten biochemischen Funktionen des periplasmatischen Kompartiments zu einem Verlust der periplasmatischen Membran wie in den Peridinin-haltigen Dinoflagellaten führen wird.

Gleichzeitig könnte die Kodierung von SufD (ORF467) und anderen Proteinen mit plastidärer Funktion auf dem Nucleomorph eine generelle Schwierigkeit des Transfers von Genen zwischen zwei eukaryoten Genomen aufzeigen. Beispiele für einen Gentransfer von Eukaryot zu Eukaryot

sind beschrieben (Archibald et al., 2003; Andersson et al., 2003), der Mechanismus ist jedoch nicht im Detail aufgeklärt.

Durch die vorliegende Arbeit wurde am Beispiel des plastidär lokalisierten SufD jedoch gezeigt, dass Nucleomorph-kodierten Proteine an wichtigen plastidären Funktionen beteiligt sind und keine nicht-funktionellen Relikte einer genomischen Reduktion darstellen..

4.2 SufD in *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana enthält Gene für die Proteine SufA bis SufS im Kerngenom. Die Aminosäuresequenzen aller dieser Proteine enthalten ein durch Computeralgorithmen vorhergesagtes Transitpeptid als topogenes Signal zum Import in die Plastide. In der vorliegenden Arbeit wurde für das SufD-Homologe ATNAP6 die plastidäre Lokalisation durch in vivo Expression von GFP-Fusionsproteinen nachgewiesen. Die Analyse der T-DNA Insertionsmutante *atnap6* zeigte einen komplexen Phänotyp, der keine unmittelbare funktionelle Zuordnung von ATNAP6 erlaubte. Vielmehr ist es notwendig, den komplexen Phänotyp von *atnap6* als Kombination von primären und sekundären Effekten in Folge der Knock-out Mutation von ATNAP6 zu betrachten.

4.2.1 Der *atnap6* Embryonaldefekt

Der für die *atnap6* Mutante charakteristische Phänotyp wurde in Kapitel 3 beschrieben. Die *atnap6* Embryonalentwicklung zeigte einen Stillstand der Entwicklung vorwiegend im globulären Stadium, und weniger häufig in späteren Phasen, wie dem herzförmigen oder Torpedostadium (Kapitel 3.4.3.3). Diese Arretierung in den Entwicklungsstadien führte zur Bildung von nicht keimfähigen abortiven Samen.

Die Plastiden aller Kohlendioxid fixierenden Pflanzenzellen entwickeln sich aus Vorläufern, den Proplastiden. Diese sind in den undifferenzierten embryonalen Zellen, den meristematischen Zellen, anzutreffen. Aus diesen Organellen entwickeln sich im Laufe der Embryonalentwicklung durch Differenzierung die Chloroplasten, die Chromoplasten, Etioplasten, Amyloplasten oder Leukoplasten. In den Chloroplasten bilden sich während der Differenzierung die Thylakoidmembranen, das Lumen und das Stroma (Mullet, 1998). In der Thylakoidmembran sind die für die Photosynthese benötigten Proteinkomplexe wie Photosystem I und II, Cytochrom- b_6f

Komplex und ATP-Synthase lokalisiert (Allen und Forsberg, 2001). Die Plastidengenome kodieren neben der benötigten Maschinerie zur Translation auch Proteine als Bestandteile für die erwähnten Systeme (Sugiura et al., 1998). Zahlreiche weitere Komponenten der Photosynthese-Systeme sind jedoch auf dem Kern kodiert und werden in die Plastide importiert.

In der normalen Embryonalentwicklung von *Arabidopsis thaliana* erfolgt die Differenzierung der Proplastide in den Chloroplasten während des Übergangs vom globulären Embryostadium in das herzförmige Stadium (Vothknecht und Westhoff, 2001). Dieser Übergang ist eine kritische Phase in der Entwicklung und wird von der Expression zahlreicher essentieller Gene gekennzeichnet (Heckel et al., 1999).

Mutationen in Genen, die zu Embryonaldefekten führen, werden bei *Arabidopsis thaliana* in die Kategorie der *EMB*-Gene (emb: Embryo-lethal oder Embryo-defekt) eingeordnet (Meinke und Sussex, 1979). Vermutlich existieren bis zu 500 *EMB*-Gene (Despres et al., 2001), Mutationen in diesen Genen führen in vielen Fällen zu einem fehlerhaften Übergang vom globulären in das herzförmige Stadium der Embryonalentwicklung, ähnlich wie im beschriebenen Fall der *atnap6* Mutation (Abbildung 4.3).

Funktionelle Untersuchungen an *EMB*-Genen mit diesem Entwicklungsdefekt zeigten, dass es sich bei den Genprodukten oftmals um notwendige plastidäre „Housekeeping“-Proteine handelte. Beispiele hierfür sind die plastidäre Glycyl-tRNA-Synthetase (Uwer et al., 1998) und die plastidäre Lysophosphatidylsäure-Acyltransferase (Yu et al., 2004), sowie die Proteine EMB506 (Albert et al., 1999; Despres et al., 2001), RASPBERRY3 (Apuya et al., 2002) und SSR16 (Tsugeki et al., 1996).

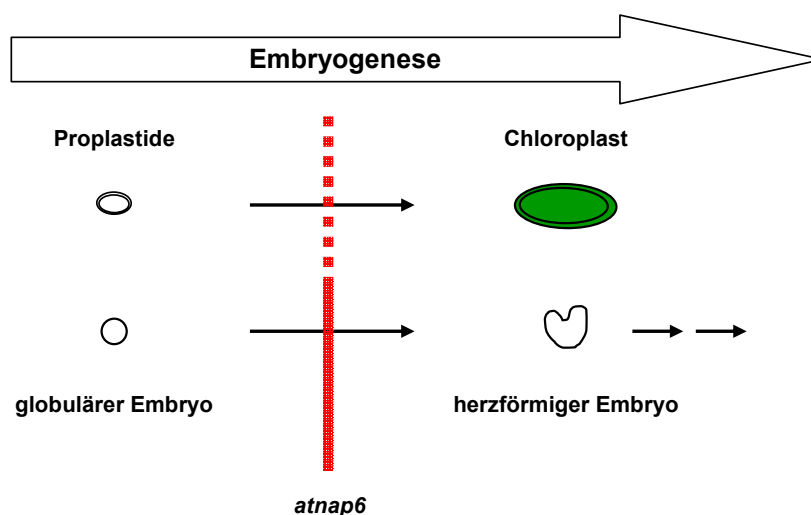


Abbildung 4.3. Effekt von *atnap6* während der Embryogenese.

Die Entwicklung vom globulären zum herzförmigen Embryo erfolgt zum Zeitpunkt der Differenzierung der Proplastide in den Chloroplasten. *atnap6* Embryos zeigten überwiegend einen Defekt in diesem Stadium der Entwicklung (rot hervorgehoben).

Die gleichen Embryonaldefekte, die Mutationen der Gene für die erwähnten plastidären Proteine verursachen, wurden ebenfalls für Mutationen von Genen des Auxin-Metabolismus und Auxin-Transports beschrieben (Hobbie et al., 2000; Hamann et al., 1999; Hardtke und Berleth, 1998). Im Stadium des globulären Embryos wird unter anderem der polare Transport von Auxin etabliert (Steinmann et al., 1999).

Diese Untersuchungen zeigten, dass Embryonaldefekte durch die Mutation von Genen für Proteine verschiedener funktioneller Kategorien hervorgerufen werden können und eine primäre Funktion des jeweiligen Proteins in der Embryonalentwicklung nicht gegeben sein muss.

4.2.2 Die *atnap6* Funktion ist nicht auf die Embryonalentwicklung beschränkt

Eine Aussage bezüglich der potentiellen Funktion eines Gens aufgrund eines beobachteten Embryonaldefekts beim Übergang vom globulären in das herzförmige Stadium ist nur schwer möglich. Für eine funktionelle Analyse ist es somit erforderlich, die phänotypische Untersuchung in einem späteren Entwicklungsstadium durchzuführen. Erschwert wird dieses durch die gerade bei Mutationen von Housekeeping-Genen häufige Lethalität einer Mutation. Auch bei nicht lethalen Mutationen ist bei der funktionellen Analyse der Pflanzen zu beachten, dass Gene, deren Mutation einen Embryonaldefekt verursacht, nicht auf eine Rolle in der eigentlichen Embryonalentwicklung beschränkt sein müssen, sondern im weiteren Verlauf der Pflanzenentwicklung durchaus weitere Funktionen übernehmen können. Dies wurde am Beispiel des Gens *EMB506* bewiesen, dem zusätzlich zur Rolle während der Embryogenese eine weitere Funktion während des vegetativem Wachstums der Pflanze zugeordnet wurde (Despres et al., 2001).

Einen wichtigen Hinweis auf eine plastidäre Funktion eines Proteins kann in diesem Fall die subzelluläre Lokalisierung des Proteins in der Plastide liefern. Eine Chloroplasten-Lokalisierung konnte in dieser Arbeit für SufD (ATNAP6) aus *Arabidopsis thaliana* eindeutig nachgewiesen werden und wird im Weiteren detaillierter diskutiert.

Im Rahmen der durchgeführten Expressionsanalysen (Kapitel 3.5) des Affymetrix-Systems und Auswertung veröffentlichter Datensätze der *Nottingham Arabidopsis Stock Center* (NASC) Datenbank (<http://affymetrix.arabidopsis.info/narrays/experimentbrowse.pl>) wurde erkennbar, dass mRNA von ATNAP6 in allen Entwicklungsstadien von *Arabidopsis thaliana* nachgewiesen

werden konnte. Die höchsten Mengen an ATNAP6 mRNA sind in grünem Blattgewebe enthalten, geringere Mengen in nichtgrünen Geweben. Dieses Expressionsmuster liefert einen klaren Hinweis auf eine plastidäre Funktion von ATNAP6. Die bekannten funktionellen Untersuchungen an Komponenten des SUF-Systems, sowohl in Prokaryoten wie auch in Eukaryoten, deuten auf eine Beteiligung an der Biosynthese von Eisen-Schwefel Clustern hin (Djaman et al., 2004; Nachin et al., 2001; Nachin et al., 2003). Proteine mit Fe-S Clustern besitzen Bedeutung für wichtige plastidäre Funktionen, somit ist eine primäre Funktion von ATNAP6 in der Embryonalentwicklung unwahrscheinlich. Die Biosynthese von Proteinen mit Fe-S Clustern durch das SUF-System gewinnt mit der Chloroplastendifferenzierung an Bedeutung, zum Beispiel für den Aufbau der Photosyntheseapparate oder der Isoprenoidbiosynthese, und ist über den gesamten Entwicklungszyklus erforderlich.

4.2.3 *atnap6* Phänotypen als Folge lichtabhängiger Regulationen ?

Durch die Oligonukleotid-Microarray Analyse (Kapitel 3.5) konnten signifikante Veränderungen der Genexpression in bestimmten Stoffwechsel- und Regulationsprozessen der *atnap6* Mutante nachgewiesen werden.

Eine direkte funktionelle Beteiligung von ATNAP6 an den verschiedenen betroffenen Prozessen, wie zum Beispiel der Anthocyanidin-Synthese ist unwahrscheinlich, vielmehr muß die Interpretation der beobachteten Veränderungen vor dem Hintergrund einer komplexen und integrierten zellulären Antwort auf den zugrunde liegenden auslösenden Faktor, die Knock-out Mutation des Gens für ATNAP6, erfolgen.

Diese Betrachtungsweise ermöglicht es, die Phänotypen der *atnap6* Mutante, wie das reduzierte Hypokotyl- und Wurzelwachstum und die Veränderungen im Anthocyanidin-Stoffwechsel, als Folge einer Beeinflussung von verschiedenen Regulationsprozessen zu diskutieren. Diese Phänotypen zeigen vermutlich direkte Verbindung zu der Funktion von ATNAP6, verdeutlichen jedoch, dass die ATNAP6 Knock-out Mutation bestimmte lichtabhängige und Cytokinin-Signalwege beeinträchtigt.

Die *atnap6* Microarray-Analyse zeigte stark erhöhte Transkriptmengen von Enzymen der Anthocyanidin-Synthese und eines zugehörigen MYB Transkriptionsfaktors.

Aus verschiedenen Untersuchungen ist bekannt, dass die Produktion von Anthocyanidin, ebenso wie das Hypocotyl-Wachstum, einer lichtabhängigen Regulation unterliegt (Ma et al., 2001; Tepperman et al., 2001; Wang et al., 2002). Die hierfür notwendigen Photorezeptoren der

Pflanze sind die Phytochrome, die Rotlicht („Red-light“, R, Wellenlänge > 600 nm) und Fern-Rotlicht („Far-red“, FR, Wellenlänge > 700 nm) detektieren. Diese regulieren verschiedene Licht-Antworten, unter anderem die Photomorphogenese und die Induktion der Blüte (Quail et al., 1995 und 2002; Neff et al., 2000). Fünf Phytochrome, phyA bis phyE, sind in *Arabidopsis thaliana* bekannt. Der primären Photorezeptoren für die Antwort auf Rot bzw. FR-Licht sind das lichtlabile phyA und das lichtbeständige phyB.

Die Phytochrome von *Arabidopsis thaliana* besitzen Homologien zu bakteriellen HIS Protein-Kinasen, jedoch fehlen die für die HIS Protein-Kinase Aktivität notwendigen konservierten Sequenzmotive (Hwang et al., 2002). Der Aufbau der Phytochrome besteht aus einer N-terminalen Domäne mit einem kovalent gebundenen linearen Tetrapyrrol-Chromophor Phytychromobilin, der C-terminale Bereich besteht aus einer HIS Protein-Kinase ähnlichen Domäne und zwei PAS Domänen. Diese PAS Domänen dienen zur Weiterleitung von Signalen und zur Regulation der Kinase-Aktivität (Taylor und Zhulin, 1999). Für phyA konnte eine Ser/Thr-Kinase-Aktivität nachgewiesen werden (Montgomery und Lagarias, 2002). Dieses deutete auf die Möglichkeit hin, dass die Lichtsignalisierung in höheren Pflanzen auf einem lichtregulierten Phosphotransfer-Mechanismus beruht.

Phytochrome interagieren in komplexer Weise mit den Blaulichtrezeptoren, den Cryptochromen, sowie zahlreichen Transkriptionsfaktoren und Komponenten unterschiedlicher Signalwege (Quail, 2002). Ein Beispiel ist der Transkriptionsfaktor PIF3, der an der frühen lichtabhängigen Chloroplasten-Entwicklung beteiligt ist (Monte et al., 2004), dem verwandten Transkriptionsfaktor PIL5, dem eine Beteiligung an der Samenkeimung und Hypokotyl-Elongation zugeschrieben wurde (Oh et al., 2004) oder dem *Arabidopsis Response Regulator* ARR4, der eine Verbindung zwischen Lichtsignalisierung und Cytokinin-Signalisierung herstellt (Sweere et al., 2001).

Über den Response Regulator ARR4 besteht eine direkte Verbindung zu lichtabhängigen Entwicklungsprozessen. ARR4 interagiert mit Phytochrome B und stabilisiert dessen FR-Licht aktive Form (Sweere et al., 2001). Neuere Untersuchungen zeigten eine Beteiligung von weiteren ARRs, ARR3, ARR5 und ARR6 an der Rotlicht-Signalisierung (To et al., 2004).

4.2.4 Reduzierte Transkription von Zellwand modifizierenden Enzymen in *atnap6*

Eine Anzahl von hydrolysierende Enzymen der Zellwand waren in der *atnap6* Mutante stark reduziert. Dazu gehörte Xyloglucan Endotransglycosylase, verantwortlich für die endolytische

Spaltung von Xyloglucan Bindungen in der Zellwand (Campbell und Braam, 1999). Weiterhin war die Transkription von mehreren Proteine der Expansin-Familie (Allergene) reduziert, diese Glycoproteine schwächen vermutlich die nichtkovalenten Bindungen der Zellwand-Polysaccharide und schaffen damit die Voraussetzung für das Wachstum der Pflanzenzellen (McQueen-Mason und Cosgrove, 1995; Whitney et al., 2000; Li und Cosgrove, 2001).

Untersuchungen von Ma et al. (2001) zeigten, dass Gene für die Lockerung der Zellwand einer starken negativen Regulation bei Lichteinstrahlung unterliegen. Die Transkriptmenge verschiedener dieser Gene war in *atnap6* stark reduziert. Der große Einfluß von Licht auf die Pflanzenentwicklung wurde schon früher am Beispiel der Inhibierung des Hypokotyl-Wachstums und der Kotyledonen-Expansion demonstriert (von Arnim und Deng, 1996). Die Reduzierung der Transkription von Zellwand-modifizierenden Enzymen und das reduzierte Hypokotylwachstum in *atnap6* kann somit eine Antwort auf Lichtstress darstellen. Dies zeigt, dass die Beeinflussung der Phytochrom-Signalisierung in *atnap6* einen komplexen Phänotyp verursacht, der keinen direkten Rückschluß auf die plastidären Funktion von ATNAP6 zulässt.

4.2.5 Die A-Type ARR Transkriptionsfaktoren in *atnap6*

Die Microarray-Analyse von *atnap6* zeigte eine deutliche Reduzierung der Transkriptmenge von vier Response Regulatoren, ARR5, ARR6, ARR7 und ARR15. Alle diese Regulatoren werden in die Kategorie der A-Type Response Regulatoren eingeordnet. In *Arabidopsis thaliana* sind insgesamt 32 Gene für putative Response Regulatoren bekannt (Hwang et al., 2002). Diese unterteilen sich in drei Familien: die A-Type ARRs, B-Type ARRs und die APRR Pseudo-Response Regulatoren.

Der Aufbau der A-Type ARRs ähnelt dem CheY Response Regulator aus *E. coli* (Imamura et al., 1998). Die Expression zahlreicher A-Type ARRs, unter anderem auch ARR3 bis ARR9, wird spezifisch und unmittelbar durch Cytokinin induziert (Taniguchi et al., 1998; Kiba et al., 1998; D'Agostino et al., 2000). Die in *atnap6* betroffenen ARRs ARR5, ARR6 und ARR7 sind die Response Regulatoren, die am stärksten durch Cytokinin induziert werden (Rashotte et al., 2003).

Die Transkription von ARR4, ARR5, ARR6 und ARR7 wird durch eine von AHK4 (CRE1) ausgehende Signalisierungs-Kaskade ausgelöst, in der die B-Type ARRs ARR1, ARR2 und ARR10 als Phosphorylierungs-abhängige Transkriptionsfaktoren für die A-Type ARRs mitwirken (Hwang und Sheen, 2001; Sakai et al., 2001).

Durch Kiba et al. (2002) wurde die Beteiligung von weiteren A-Type ARR, ARR15 und ARR16, an einem von AHK4 ausgehenden Signalisierungsweg beschrieben, der besondere Bedeutung für die Wurzelentwicklung und Morphogenese von *Arabidopsis thaliana* besitzt.

Die deutlich reduzierte Transkription von vier A-Type ARR Response Regulatoren in *atnap6* könnte somit ursächlich für die beobachtete Reduzierung des Wurzelwachstums sein und zeigt, dass die Knock-out Mutation des plastidär lokalisierten ATNAP6 Proteins zu weitgehenden zellulären Antworten führt, die zumindest teilweise mit der Cytokinin-Signalisierung der Zelle integriert sind.

4.2.6 *atnap6* Phänotypen als Folge einer Cytokinin-Signalisierung ?

Die Analyse der *Arabidopsis thaliana* Mutanten *cre1-1* und *wol* lieferte wichtige Hinweise auf eine Beteiligung der Cytokinin-Signalisierung für die morphologische Entwicklung in Wurzelgewebe (Yamada et al., 2001). Beide Mutanten konnten auf eine Mutation, die zum Funktionsverlust führte, in der Histidin-Kinase AHK4 (CRE1), einem primären Cytokinin-Rezeptor, zurückgeführt werden. Der Phänotyp der *cre1-1* und der *wol* Mutante bestand in einer stark eingeschränkten Elongation der Wurzeln und zeigte Veränderungen im vaskulären Gewebe der Wurzeln (Mahonen et al., 2000; Innoue et al., 2001).

Die Plastiden höherer Pflanzen enthalten zahlreiche Cytokinine und zugehörige Enzyme des Cytokinin-Metabolismus (Benková et al., 1999). Die Beteiligung von Cytokinin an der Plastiden-Differenzierung und Photomorphogenese sowie ein Einfluß auf den phyA-Gehalt wurde am Beispiel von Erbse nachgewiesen (Seyedi et al., 2001). Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Protein-Kinase WPK4 gleichermaßen von Licht und Cytokinin induziert wird (Ikeda et al., 1999). Der durch die Bestrahlung mit Rotlicht ausgelöste Verlust des Hypokotyl-Gravitropismus in *Arabidopsis* konnte durch die Zugabe von Cytokinin wiederhergestellt werden (Golan et al., 1996). Diese Untersuchungen deuten auf einen Zusammenhang zwischen der Cytokinin- und der lichtabhängigen Phytochrom-Signalisierung in Pflanzen hin.

Vor diesem Hintergrund scheint die Beobachtung einer Anzahl von Cytokinin-regulierten Phänotypen, wie dem reduzierten Wurzelwachstum, und Phytochrom-regulierten Phänotypen, wie dem eingeschränkten Hypokotylwachstum und der reduzierten Transkription von Enzymen der Anthocyanidin-Synthese in der *atnap6* Mutante plausibel. Die Beeinflussung Licht- oder Cytokinin-abhängiger Signalwege durch die Knockout-Mutation von ATNAP6 führt zu einem

komplexen Phänotyp, dessen Analyse durch die Wechselwirkung von Cytokinin- und Phytochrom-Signalwegen erschwert wird. Die Art der retrograden Signalisierung von Plastide zu Kern, ob durch den Transport von Mg-Protoporphyrin IX, Cytokinin oder anderen Signalmolekülen, als Folge des ATNAP6 Knock-outs bleibt unklar.

4.2.7 Reduzierter Chlorophyllgehalt in *atnap6*

Eine Interpretation des reduzierten Chlorophyllgehalts in *atnap6* Pflanzen kann durch die Einbeziehung der von Møller et al. (2001) beschriebene Beteiligung des *Arabidopsis* SUF-Systems an der Signalübermittlung von der Plastide zum Kern erfolgen. Die von Møller beschriebene Mutante *atnap1* (SufB Knock-out) zeigte einen reduzierten Chlorophyllgehalt sowie einen erhöhten Gehalt von Protoporphyrin IX im Blattgewebe. Protoporphyrin IX ist eine Vorstufe im Tetrapyrrol-Biosyntheseweg, der in der Plastide von *Arabidopsis* sowohl zur Synthese von Chlorophyll als auch zur Häm-Biosynthese dient. Die Häm-Biosynthese in den Plastiden führt zur Bildung des Chromophoren von Phytochrom, Phytochromobilin.

Die letzte gemeinsame Komponente in diesem Syntheseweg ist Protoporphyrin IX. Anschließend erfolgt die Gabelung in den Chlorophyll-Weg und den Häm-Weg. Im Chlorophyll-Weg wird durch den Einbau von Magnesium Mg-Protoporphyrin IX gebildet, im Häm-Weg Eisen unter Bildung von Protohäm eingebaut.

Von Møller et al. (2001) wurde eine Funktion von SufB in der Signalübertragung von Plastide zu Kern postuliert. Die Erhöhung des Protoporphyrin IX-Gehalts infolge der *atnap1* Mutation wurde als Resultat eines fehlerhaften Transport von Protoporphyrin IX angesehen. Dieses wird von der Protoporphyrinogen IX Oxidase (PPO), einem Membranprotein, im Plastidenenvelope aus Protoporphyrinogen IX gebildet und anschließend in das Stroma reimportiert (Reinbothe und Reinbothe, 1996). Dieser Transportprozeß sollte putativ unter Beteiligung von SufB als Bestandteil des SufBCD ABC-Transporters erfolgen. Die beobachtete Reduzierung des Chlorophyllgehalts wurde durch eine Signalfunktion von Protoporphyrin IX als negativem Regulator von kernkodierten Genen wie *Lhcb* (lichterntende Chlorophyll a/b bindende Proteine von PS II) und *Rcbs* (Ribulosebisphosphat Carboxylase, kleine Untereinheit) postuliert (Møller et al., 2001).

Nach neueren Untersuchungen, vor allem an den sogenannten *gun*-Mutationen (*gun*: genomes uncoupled), wurde jedoch deutlich, dass die Signalisierung von der Plastide zum Kern unter Bedingungen oxidativen Stresses, mit dem Ergebnis einer Reduzierung der Transkription von Photosynthese-Genen, nicht auf der Stufe von Protoporphyrin IX erfolgt. Vielmehr wurde eine

entsprechende Signalfunktion für Mg-Protoporphyrin IX nachgewiesen (Larkin et al., 2003; Strand et al., 2003).

Fraglich bleibt, ob die von Møller et al. beobachtete Akkumulation von Protoporphyrin IX eine Beteiligung des SUF-Systems an einer Signalisierung von Plastide zu Kern bedeutet, oder ob die erhöhten Mengen an Protoporphyrin IX Folge einer generellen Beeinträchtigung des Tetrapyrrol-Biosynthesewegs in der beschriebenen *sufB* Mutante ist.

Im Falle der Mutante *atnap6* wurde durch die Microarray Expressionsanalyse eine deutliche Reduzierung der Transkriptmenge wichtiger Schlüsselenzyme der Tetrapyrrol-Biosynthese gezeigt. Insbesondere nach der Gabelung des Tetrapyrrol-Wegs in den Chlorophyll- und den Häm-Syntheseweg sind Reduzierungen in den Transkriptmengen der beteiligten Gene, wie zum Beispiel von *porA*, *porB* und *porC*, den Genen für Protochlorophyllid-Reduktasen zur lichtabhängigen Chlorophyllsynthese, deutlich erkennbar. Sofern die SUF Komponenten SufB und SufD tatsächlich eine gemeinsame Funktion besitzen, dies ist unter anderem durch Interaktionsanalysen untermauert, kann die Erhöhung des Protoporphyrin IX Gehalts der *sufB* Mutante bloße Folge einer Einschränkung der nachfolgenden Syntheseschritte sein, zum Beispiel durch Einschränkung des Häm-Biosyntheseweges durch Eisenmangel mit einer nachfolgenden Akkumulation von Protoporphyrin IX.

Die von Møller beschriebene reduzierte Empfindlichkeit der *sufB* Mutante gegenüber FR (Far-Red) Licht und eine Repression von lichtregulierten Genen deutet jedoch auf eine Beeinflussung lichtabhängiger Signalwege durch die Knock-out Mutation von SufB (ATNAP1) hin. Diese Beobachtung unterstützt die bereits für ATNAP6 diskutierte Interpretation der Auswirkung des Knock-outs einer plastidär lokalisierten SUF-Komponente auf Licht- oder Cytokinin-abhängige Signalwege.

4.2.8 Lichtstress in *atnap6* Plastiden ?

Während der Photosynthese nehmen die Chlorophylle die Lichtenergie auf und wandeln sie in elektrochemische Energie um, die im Weiteren in die Reaktionszentren der Photosysteme übertragen wird. Bei einer Intensität der Lichteinstrahlung, die die Kapazitäten des Photosyntheseapparates übersteigt, droht die Bildung von Sauerstoff- und Lipidradikalen durch die Freisetzung von Elektronen der Chlorophylle im elektronisch angeregten Zustand oder durch das Überschreiten der Kapazität des Elektronen-Transportsystems (Niyogi, 1999). Die Folge ist

eine Schädigung von DNA, Proteinen und anderen plastidären Bestandteilen. Pflanzen beugen diesen potentiellen Folgen von Lichtstress unter anderem durch einen Abbau der Antennenkomplexe und der Expression einer Anzahl von Genen, zum Beispiel für die Ascorbat-Peroxidase APX2 als Radikalfänger (Karpinski et al., 1999) vor.

Die Microarray-Analyse der *atnap6* Mutante zeigte eine signifikante Erhöhung der ELIP-Transkriptmenge. ELIP („Early Light Induced Protein“) ist ein durch Lichtstress induziertes und in der Thylakoidmembran lokalisiertes Chlorophyll-bindendes Protein der CAB-Familie („Chlorophyll a/b-binding“), das in Pflanzen und photosynthetischen Bakterien vorkommt (Adamska, 1997; Adamska et al., 1999). Die ELIP Proteine sind strukturell mit den LHC-Proteinen verwandt und binden wie diese Chlorophyll und Carotenoide. Eine Funktion von ELIP besteht darin, bei der Reorganisation der Photosysteme entstehendes freies Chlorophyll zu binden und so zu verhindern, dass durch Reaktion von Sauerstoff mit elektronisch angeregtem Chlorophyll im Triplet-Zustand Sauerstoff-Radikale gebildet werden (Hutin et al., 2002). Die Energie der angeregten Chlorophylle kann über ELIP durch einen Triplet-Triplet Elektronenübergang auf die gebundenen Xanthophylle übertragen werden.

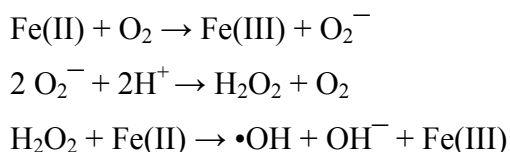
ELIP ähnelt dem cyanobakteriellen Chlorophyll-bindenden Protein IsiA, dieses wird unter Bedingungen von Eisenmangel stark exprimiert und bildet einen Ring aus 18 Untereinheiten um das trimere Photosystem I (Kouril et al., 2005). Vermutlich dient dies dem Schutz von Photosystem II vor Photooxidation, einer potentiellen Gefahr bei Defekten von Photosystem I (Havaux et al., 2005).

Durch die bei Eisenmangel reduzierte Möglichkeit zur Synthese von Fe-S Clustern für Proteine von Photosystem I wird die Funktionsfähigkeit dieses Photosystems eingeschränkt. Eine gleichbleibende Lichteinstrahlung in Photosystem II hat in diesem Fall zur Folge, dass die angeregten Elektronen nicht in notwendigem Maße in Photosystem I übertragen werden können, wie es zur Vermeidung von photooxidativem Schaden notwendig wäre. Die verstärkte Produktion von ELIPs begrenzt den bei übermäßiger Lichteinstrahlung und Defekten in den Photosystemen, verursacht durch einen Mangel an Fe-S Cluster Proteinen, drohenden Schaden in den Chloroplasten. Die Regulationsmechanismen und das retrograde Signal für die Induktion der ELIP Produktion in *Arabidopsis thaliana* unter Stressbedingungen sind nicht vollständig aufgeklärt, jedoch ist eine Beteiligung des phyA-Signalwegs beschrieben worden (Harari-Steinberg et al., 2001).

Funktionelle Untersuchungen von Komponenten des SUF-Systems erlauben es, die in *atnap6* beobachteten Phänotypen im Zusammenhang mit einer reduzierten Verfügbarkeit von Eisen für die Synthese von Fe-S Clustern und anderen Eisen enthaltenden Molekülen, zum Beispiel Häm, zu diskutieren. So wurde für die Cysteine-Desulfurase SufS und das putative Scaffold-Protein SufA aus *Arabidopsis thaliana* eine Beteiligung an der Synthese von [2Fe-2S] Clustern für Ferredoxin nachgewiesen (Ye et al., 2005; Abdel-Ghany et al., 2005). Untersuchungen des cyanobakteriellen SufR, ein Fe-S Cluster enthaltendes Protein, das als putativer transkriptioneller Repressor des *suf*-Operons (Wang et al., 2004) dient, zeigten eine Beteiligung an der Biosynthese von [4Fe-4S] Clustern für Photosystem I in *Synechocystis* (Yu et al., 2003).

4.2.9 Die subplastidäre Lokalisation von ATNAP6: Kollokalisierung mit Ferritin ?

Die Akkumulation von freiem ungebundenem Eisen in der Zelle, besonders auch in Chloroplasten, unterliegt einer strikten Kontrolle. Durch freies Eisen können durch die Fenton-Reaktion



in Verbindung mit Sauerstoff potentiell schädliche Radikale entstehen. Auch Bakterien zeigten aufgrund der Fenton-Reaktion bei Kultivierung in eisenreichem Medium eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Wasserstoffperoxid (Repine et al., 1981). Gleichzeitig ist Eisen als Bestandteil von zahlreichen Enzymen und Verbindungen, zum Beispiel von Photosystem I und Fe-S Cluster enthaltenden Enzymen wie Ferredoxin von essentieller Bedeutung für die plastidäre Funktion und damit den gesamten photosynthetisch aktiven Organismus.

In *Arabidopsis thaliana* wird Eisen in der Plastide in multimeren Ferritinkomplexen gespeichert. Diese können bis zu 4500 Eisenatome inmitten einer gebildeten Hohlraumstruktur aufnehmen (Harrison und Arosio, 1996). Das Eisen wird als Fe(III) in Ferritin gespeichert, zuvor jedoch in der Fe(II) Form gebunden und nach der Oxidation an der Ferroxidase-aktiven Domäne von Ferritin in das Innere der Ferritin-Hülle transportiert. Benötigt der zelluläre Metabolismus Eisen, erfolgt die Freisetzung durch Reduktion zu Fe(II) (Takagi et al., 1998). Die Transkription der ausschließlich plastidär lokalisierten Ferritine in *Arabidopsis thaliana* wird durch Eisen reguliert (Petit et al., 2001). Offenbar unterliegt die Ferritin-Expression in Pflanzen einer vom Entwicklungsstadium abhängigen Regulation. Während in den jüngeren basalen Bereichen der

Blätter und den Blattspitzen hohe Ferritin-Mengen nachgewiesen werden konnten, zeigten die zentralen Bereiche nur geringe Mengen (Lobréaux und Briat, 1991). Dies deutete auf eine Bedeutung von Ferritin als Eisenquelle zu einem frühen Stadium der Entwicklung, insbesondere zur Synthese eisenhaltiger Proteine für die Photosynthese. Die Akkumulation während der Seneszens wurde mit einem erhöhten Bedarf zur Speicherung von aus dem Abbau des Photosyntheseapparates freiwerdendem Eisen erklärt (Briat et al., 1999).

Die Analyse der subzellulären Lokalisation von Ferritin wurde von Escobar et al. (2003) durch die Expression von Ferritin-GFP Fusionsproteinen in Blattgewebe von *Nicotiana benthamiana* durchgeführt. Die plastidäre Lokalisation wurde bestätigt, zusätzlich zeigten die Experimente eine ungewöhnliche subplastidäre Lokalisation des Fusionsproteins in Form diskreter „Spots“ (Abbildung 4.5).

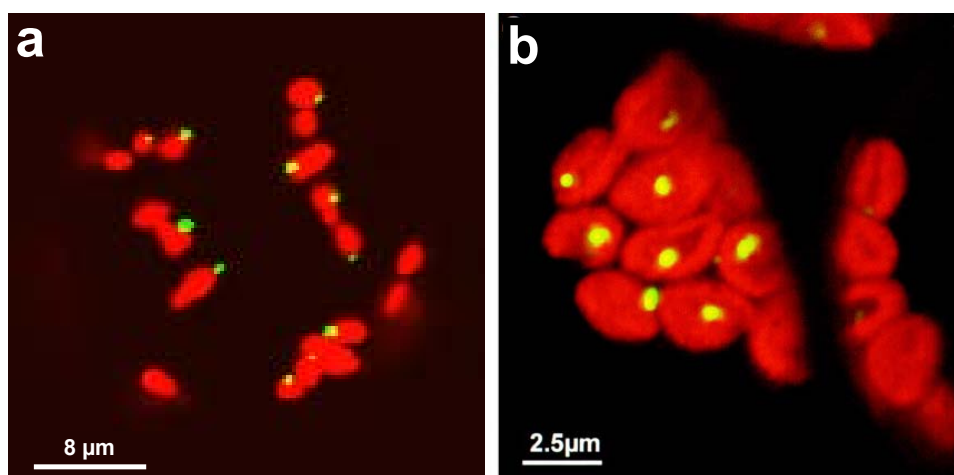


Abbildung 4.4. Vergleich der subplastidären Lokalisation von ATNAP6 und Ferritin.

a: Transiente Expression von ATNAP6-GFP Fusionsprotein in *Arabidopsis* Protoplasten (siehe Kapitel 3.3.5).

b: Transiente Expression von Ferritin-GFP Fusionsprotein in *Nicotiana benthamiana* (Abbildung aus Escobar et al., 2003). KLSM-Aufnahmen. Rote Fluoreszenz ist die Chlorophyll-Autofluoreszenz der Plastiden, Fluoreszenz von GFP ist grün bzw. gelb-grün zu erkennen.

Diese Lokalisation ähnelt in hohem Maße der bei der Expression von ATNAP6-GFP beobachteten subplastidären Verteilung des Fusionsproteins (Kapitel 3.3.2). Die derartige Lokalisation von GFP-Proteinen unterscheidet sich von einer durch spontane Aggregation und Kristallisierung entstehenden Verteilung deutlich, insbesondere durch die Beschränkung auf eine einzelne Domäne pro Plastide.

Die Verbindung zwischen ATNAP6 und Ferritin ist aufgrund fehlender Kolokalisations-Experimente spekulativ, enthält allerdings interessante Implikationen. Die Synthese von Fe-S Clustern von der Mobilisierung und Verfügbarkeit von Eisen abhängig. Die überwiegende Menge an Eisen der Plastiden ist in Form von Ferritin gespeichert, somit erfordert eine Mobilisierung von Eisen eine Rekrutierung am Ort der Speicherung. Wird nun eine Funktion von SufD (ATNAP6) in der Mobilisierung und Bereitstellung von Eisen für die plastidäre Fe-S Cluster Biosynthese, insbesondere für Komponenten der Photosysteme angenommen, so lassen sich die beschriebenen Phänotypen von *atnap6* in diesem funktionellen Zusammenhang interpretieren.

Weitere Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen ATNAP6 und Eisen lieferte die Ultrastruktur-Analyse der Plastiden von *atnap6* und die Analyse des cyanobakteriellen SufD Knock-outs.

4.2.10 *atnap6* Plastiden zeigen einen Eisenmangel-Phänotyp

Die Ultrastruktur der Plastiden von *atnap6* zeigte eine Veränderung der Thylakoidorganisation (Kapitel 3.4.3.5). Die Thylakoide erschienen im Vergleich zum Wildtyp ungeordneter und verkürzt, mit insgesamt weniger ausgeprägten Grana-Stapeln. Eine solche Veränderung deutet auf eine grundlegende Veränderung bei der Biosynthese der die Photosynthesesysteme enthaltenden Membranen hin. Ein weiterer Hinweis hierfür war die beobachtete und quantifizierte Reduzierung des Gesamtgehalts an Chlorophyll in grünem Blattgewebe, die Größenordnung der Chlorophyllreduktion lag bei 30 Prozent (Kapitel 3.4.3.4).

Sehr ähnliche Ultrastrukturen wurden in den Plastiden von Tabak (*Nicotiana tabacum*) beobachtet, wenn die Pflanzen einem Eisenmangel ausgesetzt waren (Briat et al., 1999, Abbildung 4.5). Die Plastiden zeigten weitgehend ungestapelte Thylakoide, die unregelmäßig angeordnet waren. Größere Stärke-Ansammlungen sind zu erkennen, die nach Briat et al. durch den Abbau der Thylakoide entstanden sind.

Zusätzlich zeigten die von Briat et al. untersuchten Eisenmangel-Pflanzen eine Reduzierung des Chlorophyllgehalts um 20 Prozent, dies war auch optisch durch eine hellere grüne Farbe des Blattgewebes erkennbar.

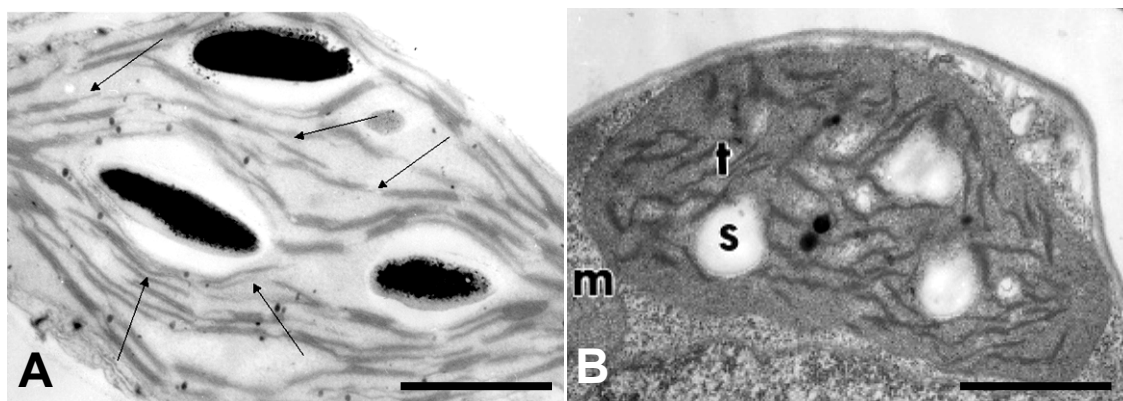


Abbildung 4.5. Ultrastruktur von *atnap6* und Eisenmangel ausgesetzten Tabak-Plastiden.

A: *atnap6* Plastide (vergleiche auch Abbildung 3.36), **B:** Plastide aus Tabak, unter Eisenmangel kultiviert (aus Briat et al., 1999), t: Thylakoide, s: Stärke. m: Mitochondrium. Maßstab 1 µm.

Der Vergleich der beiden Phänotypen zeigt, dass der Phänotyp der *atnap6* Mutante einem Eisenmangel-Phänotyp von Tabak ähnelt.

4.2.11 Der cyanobakterielle *sufD* Knock-Out: Weitere Hinweise auf Eisenmangel

Anhand von Untersuchungen bakterieller SUF-Systeme in *E. coli* und *E. chrysanthemi* wurde eine spezifische Induzierbarkeit des *suf*-Operons unter Bedingungen oxidativen Stresses und Eisenmangels gezeigt (Nachin et al., 2003; Outten et al., 2004). Von Outten et al. (2004) wurde eine Funktion des Komplexes SufBCD diskutiert, der in der Bereitstellung von Eisen unter Bedingungen von oxidativem Stress besteht. Die Eisenvorräte der Zelle liegen grundsätzlich in Form eines labilen Eisenvorrats, der für die Synthese von eisenhaltigen Enzymen dient, und einem Eisenvorrat, der aus in Eisenspeicher-Proteinen und Fe-S- und Häm-haltigen Proteinen besteht (Woodmansee und Imlay, 2002).

Oxidativer Stress ändert die Verteilung des Eisens in der Zelle in Richtung der fest gebundenen Form, unter anderem durch Expression des Proteins Dps (DNA-binding protein from starved cells) in *E. coli* (Illari et al., 2002), dieses bindet Eisen durch Bildung Ferritin-ähnlicher oligomerer Strukturen. Diese Umverteilung verringert die Gefahr von oxidativem Schaden durch die Fenton-Reaktion, führt jedoch gleichzeitig zu einem erhöhten Bedarf an Enzymen, die eine Bereitstellung von gebundenem Eisen für die Aufrechterhaltung der notwendigen Fe-S Cluster garantieren.

Eine Beteiligung von SufBCD an dem Prozeß der Eisenmobilisierung unter oxidativem Stress konnte aufgrund fehlender experimenteller Hinweise nur theoretisch diskutiert werden (Outten et al., 2004), gewinnt aber durch die vorliegende Arbeit und dem Vergleich mit dem SUF-System aus *Arabidopsis thaliana* an Relevanz. Die Ähnlichkeit der subplastidären Lokalisation von Ferritin und ATNAP6 (SufD) in *Arabidopsis thaliana* und die beschriebenen Eisenmangel-Phänotypen können einen Ansatzpunkt für die funktionelle Verbindung der bakteriellen SufBCD Proteine und des *Arabidopsis* SufD Proteins darstellen.

Die Messung der Eisenaufnahme in heterogenomischen *Aslr0076* (*sufD*) Kulturen von *Synechocystis* zeigte eine im Vergleich zum Wildtyp erkennbar höhere Aufnahmerate. Dieses zunächst ungewöhnliche Ergebnis ist vor dem Hintergrund einer fehlerhaften Eisenmobilisierung in der Mutante zu interpretieren. Durch die Einschränkung der Fe-S Cluster Biosynthese des SUF-Systems, hervorgerufen durch die fehlende Bereitstellung von Eisen aus den cyanobakteriellen Eisenspeichern wie zum Beispiel Bacterioferritin, entsteht ein Eisenmangel-Signal, das zur Induktion von Transportsystemen zur Eisenaufnahme aus dem extrazellulären Raum führt. Ähnliche Phänotypen wurden in Pflanzen beobachtet. Die Mutanten *brz* (Kneen et al., 1990) und *dgl* (Grusak und Pezeshgi, 1996) am Beispiel von Erbse (*Pisum sativum*) und *chloronerva* in Tomate (Ling et al., 1996) zeigten eine Erhöhung der Eisenaufnahme als Folge eines Defekts in der Eisenspeicherung. Somit unterstützt die Analyse der *Synechocystis* SufD-Mutante die Annahme eines ähnlichen Eisenmangel-Zustands in *atnap6*.

Weitere Parallelen könnten zwischen der stark induzierten Anthocyanidin-Synthese und der beobachteten Verfärbung des Kulturmediums in *Synechocystis Aslr0076* (Kapitel 3.2.2) bestehen. Möglicherweise erfolgt die Sezernierung eines Sonnenschutz-Proteins durch das Cyanobakterium zur Reduzierung drohenden oxidativen Schadens in Antwort auf den Defekt der Fe-S Cluster Synthese und ähnelt damit der Stressantwort der *atnap6* Mutante. Jedoch ist zuvor die Aufklärung der genauen Natur der sezernierten Substanz erforderlich.

Die *Synechocystis* Mutante *Aslr0076* lieferte somit Hinweise, die in einen funktionellen Kontext mit der umfassenderen Analyse der *atnap6* Mutante gebracht werden können. Der zusätzlich beobachtete Zellteilungsphänotyp der *Aslr0076* Mutante bei Zugabe von Glukose zum Kulturmedium (Kapitel 3.2.4) bleibt jedoch weiter unklar und erfordert weitere Untersuchungen.

4.3 Ein Modell für die Funktion von ATNAP6 in *Arabidopsis thaliana*

Mehrere beschriebene Effekte der Deletion von SufD / ATNAP6 können mit einem Eisenmangel in Verbindung gebracht werden. Wird nun angenommen, dass die Komponenten SufB, SufC und SufD zusammen mit der Cysteine-Desulfurase SufS und dem Scaffold-Protein SufA an der Synthese von Fe-S Clustern für Proteine wie Ferredoxin beteiligt sind, so liegt der Schluß nahe, die Funktion von SufD mit einer Mobilisierung oder Bereitstellung von Eisen für die Biosynthese der Fe-S Cluster zu erklären (Abbildung 4.6).

Nach diesem Ansatz stellt SufD, vermutlich in Zusammenwirken mit SufC und SufB Eisen aus den Eisenspeichern der Plastide, vorwiegend Ferritin, für die Synthese der Cluster an SufA zur Verfügung. Bislang wurde jedoch für SufBCD keine direkte Fähigkeit zur Eisenbindung nachgewiesen. Offen bleibt deshalb der Mechanismus und das Substrat des vermutlich ATP-abhängigen Transportprozesses, der durch SufBCD vermittelt werden könnte.

Wird SufD durch Knockout-Mutation deletiert, entsteht eine deutliche Einschränkung der Kapazität zur Synthese von Fe-S Clustern in der Plastide, da die niedrige Konzentration an freiem Eisen im Stroma nicht ausreicht, um die erforderliche Syntheserate zu erreichen.

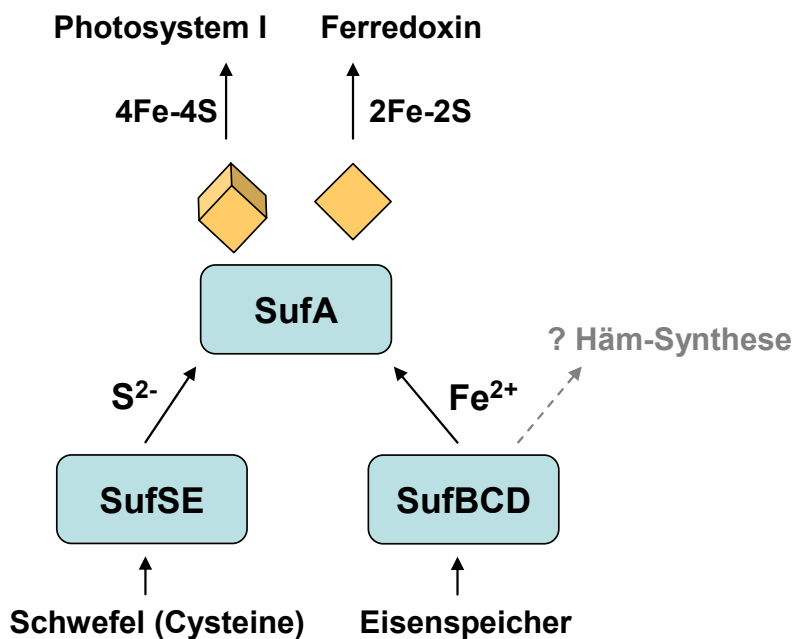


Abbildung 4.6. Modell der Fe-S Cluster Biosynthese des SUF-Systems.

Als Folge entsteht durch Defekte im Photosyntheseapparat ein photooxidativer Schaden, der eine Signalisierung an den Kern auslöst und zur Induktion von Schutzsystemen vor Lichteinstrahlung, wie der Produktion von ELIPs und Anthocyanidin führt. Weiterhin erfolgt eine Einschränkung der plastidären Tetrapyrrol-Biosynthese, zum einen durch einen Mangel an Eisen für die Häm-Produktion, zum anderen durch die notwendige Begrenzung von freiem Chlorophyll, welches ein zusätzliches photooxidatives Risiko im Chloroplasten darstellt. Interessant ist an diesem Punkt die mögliche Koppelung der retrograden Signalisierung durch Intermediate der Tetrapyrrolsynthese wie Mg-Protoporphyrin IX mit dem Status von Photosystem I und der Aktivität des SUF-Systems.

Die Microarray-Analyse von *atnap6* zeigte eine Reduzierung der Transkription von mehreren A-Type Response Regulatoren. In Verbindung mit den beobachteten Phänotypen von Cytokinin- oder Phytochrom-regulierten Prozessen deutet dies auf eine mögliche Beeinflussung der retrograden Signalisierung von Plastide zu Kern als Folge der Einschränkung der SUF-Funktionalität hin, die plastidären Faktoren einer Signalisierung bleiben jedoch unbekannt.

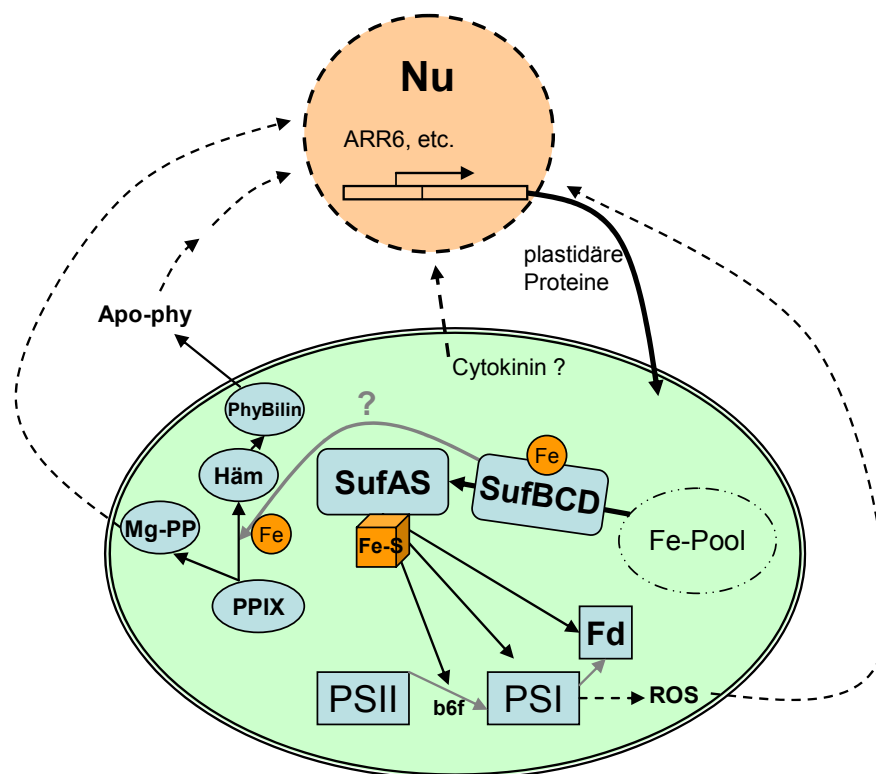


Abbildung 4.7. Modell der Funktion von ATNAP6 / SufD.

Die Abbildung zeigt die vorgestellte Funktion des SUF-Systems für die Synthese von Fe-S Clustern und der Mobilisierung von Eisen in *Arabidopsis thaliana*. Gestrichelte Pfeile zeigen bekannte Signalwege zwischen Plastide und Kern. PPIX: Protoporphyrin IX, Mg-PP: Mg-Protoporphyrin IX, PhyBilin: Phytochromobilin, Fd: Ferredoxin, ROS: Reaktive Sauerstoff-Verbindungen.

Eine Induktion der Phytochrom-Signalisierung durch ein plastidäres Signal ist ebenfalls denkbar. Die Tetrapyrrol-Chromophore von Phytochrom werden im Chloroplasten synthetisiert, somit könnte eine Einschränkung der Tetrapyrrol-Biosynthese, eventuell als Folge von Eisenmangel durch die Einschränkung der SUF-Funktionalität direkte Auswirkungen auf die lichtabhängige Signalisierung besitzen.

Die ursprüngliche Vorstellung, dass die retrograde Signalisierung von der Plastide zum Kern durch einen einzigen Plastiden-Faktor erfolgt (Oelmüller, 1989; Taylor, 1989), wurde später durch ein komplexeres Modell ersetzt. In diesem wirken mehrere verschiedene Signalwege zusammen, die aus der Tetrapyrrol-Biosynthese (Mochizuki et al., 2001), der plastidären Proteinsynthese (Sullivan und Gray, 1999) und aus der Photosynthese (Pfannschmidt et al., 2001) entspringen und vermutlich über einen integrativen Faktor der Transkriptionsmaschinerie die Expression von kernkodierten Proteinen regulieren (Gray et al., 2002).

Die enge Vernetzung der verschiedenen Signalwege erschwert die phänotypische Analyse einer Knock-out Mutante und den Rückschluß auf eine mögliche Proteinfunktion durch die Kombination von primären, direkt mit dem Knock-out in Verbindung stehenden, und sekundären, durch geänderte Signalisierung hervorgerufenen Phänotypen. Auch im Fall der *atnap6* Mutante zeigten sich die Phänotypen einer komplexen Antwort auf den zugrundeliegenden plastidären Defekt. Durch die Microarray-Analyse konnten Hinweise auf die Beeinflussung der retrograden Signalisierung von Plastide zum Kern durch den ATNAP6 Knock-out gewonnen werden. Dies erlaubte die Identifizierung von sekundären Phänotypen, die durch eine geänderte Phytochrom- und Cytokinin-Signalisierung hervorgerufen wurden. Hierzu zählen die Reduzierung des Wurzel- und Hypokotylwachstums und die Induktion der Genexpression von Lichtstress-Proteinen und Enzymen zur Anthocyanidin-Synthese.

Durch die Ultrastruktur-Analyse der Plastiden zeigten sich Phänotypen, die auf Eisenmangel in der Plastide hinwiesen. Die funktionelle Verbindung der beobachteten Phänotypen mit weiteren experimentellen Daten erlaubte es, eine mögliche Funktion von ATNAP6 / SufD zu skizzieren, die in der Bereitstellung von Eisen für die Fe-S Cluster Biosynthese in der Plastide besteht.

Auf Grundlage dieser Arbeit bieten sich vielfältige Möglichkeiten, die weiteren Analysen zur Aufklärung der biochemischen Funktion von ATNAP6 und des SUF-Systems fortzuführen.

5 Zusammenfassung

Durch die vorliegende Arbeit konnte ein Beitrag zur funktionellen Charakterisierung des Nucleomorph-kodierten und plastidär lokalisierten Proteins ORF467 aus *Guillardia theta* geleistet werden. Dieses Protein konnte durch Sequenzhomologien als Bestandteil SufD des plastidären SUF-Systems identifiziert werden. Mit immunologischen Methoden konnte SufD in der Plastide von *Guillardia theta* nachgewiesen werden. Ein Gen für eine weitere Komponente des SUF-Systems, SufS, wurde durch die Auswertung von EST-Daten im Kerngenom lokalisiert. Die Cryptomonade *Guillardia theta* enthält damit ein über drei Genome, Kern, Plastide und Nucleomorph, verteiltes plastidäres SUF-System.

Die heterogenomische Knock-out Mutation von SufD in *Synechocystis* führte zu einem Defekt der Zellteilung, der durch die Bildung von aus vier Zellen bestehenden Teilungsstadien gekennzeichnet war. In Importexperimenten mit radioaktivem Eisen wurde eine erhöhte Eisenaufnahme der SufD-Mutante gemessen.

Die Analyse einer T-DNA Mutante des SufD-Homologen ATNAP6 in *Arabidopsis thaliana* zeigte Defekte in der Embryonalentwicklung, eine veränderte Ultrastruktur der Chloroplasten, sowie ein reduziertes Wurzelwachstum und verringerten Chlorophyllgehalt der Pflanzen. Durch die in vivo Expression von GFP-Fusionsproteinen von ATNAP6 in Protoplasten konnte eine plastidäre Lokalisation von ATNAP6 nachgewiesen werden. Das Lokalisationsmuster zeigte eine Verteilung der GFP-Fluoreszenz in abgegrenzten subplastidären Bereichen, die für die subplastidäre Lokalisation notwendige β -helikale Proteindomäne von ATNAP6 wurde durch die Generierung und in vivo Expression von modifizierten ATNAP6-GFP Fusionsproteinen identifiziert.

In einer Expressionsanalyse mit einem Oligonukleotid-Genchip Microarray konnten signifikante Änderungen der Expression von regulativen Genen und von Genen in verschiedenen Stoffwechselwegen der ATNAP6 Knock-out Mutante gemessen werden. Die Expressionsdaten der ATNAP6 Knock-out Mutante und der komplexe Phänotyp von *atnap6* konnten als Folge eines grundlegenden Defekts des plastidären SUF-Systems zur Synthese von Eisen-Schwefel Clustern interpretiert werden und ermöglichten es, ein Modell für die Funktion von ATNAP6 in *Arabidopsis thaliana* zu formulieren.

6 Literatur

- Abdel-Ghany, S.E., Ye, H., Garifullina, G.F., Zhang, L., Pilon-Smits, E.A., Pilon, M. (2005) Iron-sulfur cluster biogenesis in chloroplasts. Involvement of the Scaffold Protein CpIscA. *Plant Physiol.* **138**: 161-172
- Adamska, I. (1997) ELIPs – Light induced stress proteins. *Physiol. Plant.* **100**: 794-805
- Adamska, I., Roobol-Boza, M., Lindahl, M., Andersson, B. (1999) Isolation of pigment-binding early light-inducible proteins from pea. *Eur. J. Biochem.* **260**: 453-460
- Agar, J.N., Krebs, C., Frazzon, J., Huynh, B.H., Dean, D.R. and Johnson, M.K. (2000) IscU as a scaffold for iron-sulfur cluster biosynthesis: sequential assembly of [2Fe-2S] and [4Fe-4S] clusters in IscU. *Biochemistry* **39** (27): 7856-7862
- Albert, S., Despres, B., Guilleminot, J., Bechtold, N., Pelletier, G., Delseny, M., Devic, M. (1999) The EMB506 gene encodes a novel ankyrin repeat containing protein that is essential for the normal development of *Arabidopsis* embryos. *Plant J.* **17**: 169-179
- Allen, J.F. (1993) Redox-control of gene expression and the function of chloroplast genomes: a hypothesis. *Photosynth. Res.* **36**: 95-102
- Allen, J.F. (2003) The function of genomes in bioenergetic organelles. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **358**: 19-38
- Allen, J.F., Forsberg, J. (2001) Molecular recognition in thylakoid structure and function. *Trends Plant Sci.* **6** (7): 317-326
- Allen, J.F., Raven, J.A. (1996) Free-radical-induced mutation vs redox regulation: costs and benefits of genes in organelles. *J. Mol. Evol.* **42**: 482-492

- Altmann, T., Damm, B., Halfter, U., Willmitzer, L., Morris, P.-C. (1992). Protoplast transformation and methods to create specific mutants in *Arabidopsis thaliana*. In *Methods in Arabidopsis Research* (Koncz, Cs., Chua, N.-H. and Schell, J., eds). Singapore: World Scientific Publishing Co., Pte. Ltd., pp. 310-330
- Andersson, J.O., Sjögren, Å.M., Davis, L.A.M., Embley, T.M., Roger, A.J. (2003) Phylogenetic analyses of diplomonad genes reveal frequent lateral gene transfers affecting eukaryotes. *Curr. Biol.* **13**: 94–104
- Apuya, N.R., Yadegari, R., Fischer, R.L., Harada, J.H., Goldberg, R.B. (2002) RASPBERRY3 gene encodes a novel protein important for embryo development. *Plant Physiol.* **129** (2): 691-705
- Archibald, J.M., Rogers, M.B., Toop, M., Ishida, K., Keeling, P.J. (2004) Lateral gene transfer and the evolution of plastid-targeted proteins in the secondary plastid-containing alga *Bigeloviella natans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **100**: 7678-7683
- Baulcombe, D.C., Saunders, G.R., Bevan, M.W., Mayo, M.A., Harrison, B.D. (1986) Expression of biologically-active viral satellite RNA from the nuclear genome of transformed plants. *Nature* **321**: 446-449
- Beinert, H., Kiley, P.J. (1999) Fe-S proteins in sensing and regulatory functions, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**: 152-157
- Benková, E., Witters, E., Van Dongen, W., Motyka, V., Brzobohatý, B., Van Onckelen, H.A., Macháckova, I. (1999) Cytokinins in tobacco and wheat chloroplasts. Occurrence and changes due to light/dark treatment. *Plant Physiol.* **121**: 245-252
- Bhattacharya, D., Medlin, L. (1995) The phylogeny of plastids: A review based on comparisons of small subunit ribosomal rna coding regions. *J. Phycol.* **31**: 489-498
- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254

- Briat, J.F., Lobreaux, S., Grignon, N., Vansuyt, G. (1999) Regulation of plant ferritin synthesis: how and why. *Cell. Mol. Life Sci.* **56**: 155-166
- Butterfield, N.J. (2000) *Bangiomorpha pubescens* n. gen., n. sp.: Implications for the evolution of sex, multicellularity, and the Mesoproterozoic/Neoproterozoic radiation of eukaryotes. *Paleobiology* **263**, 386-404
- Campbell, P., Braam, J. (1999) Xyloglucan endotransglycosylases: Diversity of genes, enzymes and potential wall-modifying functions. *Trends Plant Sci.* **9**: 361-366
- Cavalier-Smith, T. (2003) Genomic reduction and evolution of novel genetic membranes and protein-targeting machinery in eukaryote-eukaryote chimaeras (meta-algae). *Philos. Trans. R. Soc. London B* **358**: 109-134
- D'Agostino, I.B., Deruère, J., Kieber, J.J. (2000) Characterization of the response of the *Arabidopsis* Response Regulator gene family to cytokinin. *Plant Physiol.* **124**: 1706-1717
- Delwiche, C.F., Palmer, J. (1997) The origin of plastids and their spread via secondary symbiosis. Origins of the algae and their plastids. Bhattacharya, D. (ed.) Springer, Wien, Seite 53-86
- Despres, B., Delseny, M., Devic, M. (2001) Partial complementation of embryo defective mutations: a general strategy to elucidate gene function. *Plant J.* **27** (2): 149-159
- Djaman, O., Outten, F.W., Imlay, J.A. (2004). Repair of oxidized iron-sulfur clusters in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **279** (43): 44590-44599
- Dos Santos, P.C., Smith, A.D., Frazzon, J., Cash, V.L., Johnson, M.K., Dean, D.R. (2004) Iron-sulfur cluster assembly: NifU-directed activation of the nitrogenase Fe protein. *J. Biol. Chem.* **279**: 19705-19711
- Douglas, S. E., Turner, S. (1991) Molecular evidence for the origin of plastids from a cyanobacterium-like ancestor. *J. Mol. Evol.* **33**: 267-273

- Douglas, S., Penny, S.L. (1999) The plastid genome of the cryptophyte alga, *Guillardia theta*: Complete sequence and conserved syntenic groups confirms its common ancestry with red algae. *J. Mol. Evol.* **48**: 236-244
- Douglas, S., Zauner, S., Fraunholz, M., Beaton, M., Penny, S., Deng, L.T., Wu, X., Reith, M., Cavalier-Smith, T., Maier, U.-G. (2001) Complete genome sequence of an enslaved algal nucleus. *Nature* **410**: 1091-1096
- Ellis, K.E.S., Clough, B., Saldanha, J.W., Wilson, R.J.M. (2001) Nifs and Sufs in malaria. *Mol. Microbiol.* **41** (5): 973-981
- Escobar, N.M., Haupt, S., Thow, G., Boevink, P., Chapman, S., Oparka, K. (2003) High-throughput viral expression of cDNA-Green Fluorescent Protein fusions reveals novel subcellular addresses and identifies unique proteins that interact with plasmodesmata. *Plant Cell* **15**: 1507-1523
- Foth, B.J., Ralph, S.A., Tonkin, C.J., Struck, N.S., Fraunholz, M., Roos, D.S., Cowman, A.F., McFadden, G.I. (2003) Dissecting apicoplast targeting in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science* **299**: 705-708
- Fraunholz, M.J., Mörschel, E., Maier, U.G. (1998) The chloroplast division protein FtsZ is encoded by a nucleomorph gene in cryptomonads. *Mol. Gen. Genet.* **260**: 207-211
- Frazzon, J., Dean, D. R. (2002) Biosynthesis of the nitrogenase iron-molybdenum-cofactor from *Azotobacter vinelandii*. *Met. Ions Biol. Syst.* **39**: 163-189
- Gilson, P.R. (2001) Nucleomorph genomes: much ado about practically nothing. *Genome Biol.* **2** (8): Reviews1022
- Gilson, P.R., McFadden, G.I. (2002) Jam packed genomes- a preliminary, comparative analysis of nucleomorphs. *Genetica* **115** (1): 13-28
- Glöckner, G., Rosenthal, A., Valentin, K. (2000) The structure and genome repertoire of an ancient red algal plastid genome. *J. Mol. Evol.* **51**: 382-390

- Golan, A., Tepper, M., Soudry, E., Horwitz, B.A., Gepstein, S. (1996) Cytokinin, acting through ethylene, restores gravitropism to *Arabidopsis* seedlings grown under red light. *Plant Physiol.* **112**: 901-904
- Gray, J.C., Sullivan, J.A., Wang, J.-H., Jerome, C.A., MacLean, D. (2003) Coordination of plastid and nuclear gene expression. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **358**: 135-145
- Gray, M.W. (1999) Evolution of organellar genomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9**: 678-687
- Grigorieva, G., Shestakov, S. (1982) Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. 6803. *FEMS Microbiol. Letters* **13**: 367-370
- Greenwood, A.D. (1974) The Cryptophyta in relation to phylogeny and photosynthesis. In *8th Int. Congr. of Electron Microscopy* (ed. J. Sanders & D. Goodchild), pp. 556-567. Canberra: Australian Academy of Sciences
- Grusak, M.A., Pezeshgi, S. (1996) Shoot-to-root signal transmission regulates root Fe(III) reductase activity in the *dgl* mutant of pea. *Plant Physiol.* **110**: 329-334
- Guillard, R. R. L. (1975) Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. in *Culture of Marine Invertebrate Animals*. New York, Plenum Press: 29-60
- Hamann, T., Mayer, U., Jürgens, G. (1999) The auxin-insensitive *bodenlos* mutation affects primary root formation and apical-basal patterning in the *Arabidopsis* embryo. *Development* **126**: 1387-1395
- Hantke, K. (1981) Regulation of ferric iron transport in *Escherichia coli* K12: isolation of a constitutive mutant. *Mol. Gen. Genet.* **182**: 288-292
- Harari-Steinberg, O., Ohad, I., Chamovitz, D.A. (2001) Dissection of the light signal transduction pathways regulating the two Early Light-Induced Protein genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **127**: 986-997

- Hardtke, C.S., Berleth, T. (1998) The *Arabidopsis* gene MONOPTEROS encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development. *EMBO J.* **17**: 1405-1411
- Harrison, P.M., Arosio, P. (1996) The ferritins: molecular properties, iron storage, function and cellular regulation. *Biochim. Biophys. Acta* **1275**: 161-203
- Havaux, M., Guedeney, G., Hagemann, M., Yermenko, N., Matthijs, H.C., Jeanjean, R. (2005) The chlorophyll-binding protein IsiA is inducible by high light and protects the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 from photooxidative stress. *FEBS Lett.* **579**: 2289-2293
- Heckel, T., Werner, K., Sheridan, W.F., Dumas, C., Rogowsky, P.M. (1999) Novel phenotypes and developmental arrest in early embryo specific mutants of maize. *Planta* **210**: 1-8
- Hibberd, D.J., Norris, R.E. (1984) Cytology and ultrastructure of *Chlorarachnion reptans* (Chlorarachniophyta divisio nova, Chlorarachniophyceae classis nova) *J. Phycol.* **20**: 310-330
- Hjorth, E., Hadfi, K., Gould, S., Kawach, O., Sommer, M., Zauner, S., Maier, U.-G. (2004) Zero, one, two, three, and perhaps four. Endosymbiosis and the gain and loss of plastids. *Endocytobiosis Cell Res.* **15**: 459-468
- Hjorth, E., Hadfi, K., Zauner, S., Maier, U.-G. (2005) Unique genetic compartmentalization of the SUF system in cryptophytes and characterization of a SufD mutant in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **579** (5): 1129-1135
- Hobbie, L., McGovern, M., Hurwitz, L.R., Pierro, A., Liu, N.Y., Bandyopadhyay, A., Estelle, M. (2000) The *arx6* mutants of *Arabidopsis thaliana* define a new gene involved in auxin response and early development. *Development* **127**: 23-32
- Hutin, C., Nussaume, L., Moise, N., Moya, I., Kloppstech, K., Havaux, M. (2002) Early light-induced proteins protect *Arabidopsis* from photooxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100** (8): 4921-4926
- Hwang, I., Chen, H.C., Sheen, J. (2002) Two-component signal transduction pathways in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **129**: 500-515

- Hwang, I., Sheen, L. (2001) Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature* **413**: 383–389
- Ihaka, R., Gentleman, R. (1996) R: A Language for Data Analysis and Graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics* Vol. **5** (3): 299-314
- Ikeda, Y., Koizumi, N., Kusano, T., Sano, H. (1999) Sucrose and cytokinin modulation of WPK4, a gene encoding a SNF-1-related protein kinase from wheat. *Plant Physiol.* **121**: 813-820
- Illari, A., Ceci, P., Ferrari, D., Rossi, G.L., Chiancone, E. (2002) Iron incorporation into *Escherichia coli* Dps gives rise to a ferritin-like microcrystalline core. *J. Biol. Chem.* **277**: 37619-37623
- Inoue, T., Higuchi, M., Hashimoto, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Kato, T., Tabata, S., Shinozaki, K., Kakimoto, T. (2001) Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature* **409**: 1060–1063
- Inskeep, W.P., Bloom, P. R. (1985) Extinction coefficients of Chlorophyll a and b in N,N-Dimethylformamide and 80% Acetone. *Plant Physiol.* **77**: 483-485
- Jeanmougin, F., Thompson, J.D., Gouy, M., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1998) Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem. Sci.* **23**: 403-405
- Johnson, M.K. (1998) Iron-sulfur proteins: new roles for old clusters. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**: 173-181
- José M. Alonso, Anna N. Stepanova, Thomas J. Leisse, Christopher J. Kim, Huaming Chen, Paul Shinn, Denise K. Stevenson, Justin Zimmerman, Pascual Barajas, Rosa Cheuk, Carmelita Gadrinab, Collen Heller, Albert Jeske, Eric Koesema, Cristina C. Meyers, Holly Parker, Lance Prednis, Yasser Ansari, Nathan Choy, Hashim Deen, Michael Geralt, Nisha Hazari, Emily Hom, Meagan Karnes, Celene Mulholland, Ral Ndubaku, Ian Schmidt, Plinio Guzman, Laura Aguilar-Henonin, Markus Schmid, Detlef Weigel, David E. Carter, Trudy Marchand, Eddy Risseuw, Debra Brogden, Albana Zeko, William L. Crosby, Charles C. Berry, and Joseph R. Ecker (2003) Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana* *Science* **301**: 653-657

- Karpinski, S., Reynolds, H., Karpinska, B., Wingsle, G., Creissen, G., Mullineaux, P. (1999) Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *Science* **284**: 654-657
- Katoh, H., Grossman, A.R., Hagino, N., Ogawa, T. (2000) A gene of *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 encoding a novel iron transporter. *J. Bacteriol.* **182** (22): 6523-6524
- Kneen, B.E., Larue, T.A., Welch, R.M., Weeden, N.F. (1990) Pleiotropic effects of *brz*. A mutation in *Pisum sativum* (L.) cv 'Sparkle' conditioning decreased nodulation and increased iron uptake and leaf necrosis. *Plant Physiol.* **93**: 717-722
- Kouril, R., Arteni, A.A., Lax, J., Yermenko, N., D'Haene, S., Rogner, M., Matthijs, H.C., Dekker, J.P., Boekema, E.J. (2005) Structure and functional role of supercomplexes of IsiA and Photosystem I in cyanobacterial photosynthesis. *FEBS Lett.* **579**: 3253-3257
- Kowallik, K.V., Stoebe, B., Schaffran, I., Kroth-Pancic, P., Freier, U. (1995) The chloroplast genome of a chlorophyll a+c-containing alga, *Odontella sinensis*. *Plant Mol. Report* **13**: 336-342
- Kurihara, T., Mihara, H., Kato, S., Yoshimura, T. and Esaki, N. (2003). Assembly of iron-sulfur clusters mediated by cysteine desulfurases, IscS, CsdB and CSD, from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **1647** (1-2): 303-309
- Kurland, C.G. (1992) Evolution of mitochondrial genomes and the genetic code. *BioEssays* **14**: 709-714
- Kyhse-Andersen, J. (1984) Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Meth.* **10**: 203-209
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Larkin, R.M., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Chory, J. (2003) GUN4, a regulator of chlorophyll synthesis and intracellular signalling. *Science* **299**: 902-906

- Law, A.E., Mullineaux, C.W., Hirst, E.M.A., Saldanha, J., Wilson, R.J.M. (2000) Bacterial orthologues indicate the malarial plastid gene *ycf24* is essential. *Protist* **151**: 317-327
- Li, C., Wong, W.H. (2001) Model-based analysis of oligonucleotide arrays: model validation, design issues and standard error application. *Genome Biology* **2** (8): research0032.1-research0032.11
- Li, L.C., Cosgrove, D.J. (2001) Grass group I pollen allergens (beta-expansins) lack proteinase activity and do not cause wall loosening via proteolysis. *Eur. J. Biochem.* **268**: 4217-4226
- Lill, R., Kispal, G. (2000) Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* **25**: 352-356
- Lill, R., Mühlenhoff, U. (2005) Iron-sulfur-protein biogenesis in eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* **30** (3): 133-141
- Ling, H.Q., Pich, A., Scholz, G., Ganai, M.W. (1996) Genetic analysis of two tomato mutants affected in the regulation of iron metabolism. *Mol. Gen. Genet.* **252**: 87-92
- Liu Q., Zhu Y.-S., Wang B.-H., Li Y.-X. (2002) A HMM-based method to predict the transmembrane regions of β -barrel membrane proteins. *Computational biology and chemistry* **00**: 1-8
- Lobréaux, S., Briat, J.F. (1991) Ferritin accumulation and degradation in different organs of pea (*Pisum sativum*) during development. *Biochem. J.* **274**: 601-606
- Loiseau, L., Ollagnier-de-Choudens, S., Nachin, L., Fontecave, M. and Barras, F. (2003). Biogenesis of Fe-S cluster by the bacterial Suf system. *J. Biol. Chem.* **278** (40): 38352-38359
- Ma, L., Li, J., Qu, L., Hager, J., Chen, Z., Zhao, H., Deng, X.W. (2001) Light control of *Arabidopsis* development entails coordinated regulation of gene expression and cellular pathways. *Plant Cell* **13**: 2589-2607

- Mahonen, A.A., Bonke, M., Kauppinen, L., Riikone, M., Benfey, P.N., Helariutta, Y. (2000) A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the *Arabidopsis* root. *Genes Dev.* **14**: 2938–2943
- Maier, U.-G., Douglas, S., Cavalier-Smith, T., 2000. The nucleomorph genomes of cryptophytes and chlorarchniophytes. *Protist* **151**: 103-109
- Maier, U.-G., Hofmann, C. J. B., Eschbach, S., Wolters, J., and Igloi, G. L. (1991) Demonstration of nucleomorph-encoded eukaryotic small subunit ribosomal RNA in cryptomonads. *Mol. Gen. Genet.* **230** (1-2): 155-60.
- Margulis, L. (1970) *Origin of Eukaryotic Cells*. University Press, New Haven.
- Martelli P.L., Fariselli P., Krogh A., Cassadio, R. (2002) A sequence-profile-based HMM for predicting and discriminating β -barrel membrane proteins. *Bioinformatics* **18**: S46-S53
- Martin, W., Rujan, T., Richly, E., Hansen, A., Cornelsen, S., Lins, T., Leister, D., Stoebe, B., Hasegawa, M., Penny, D. (2002) Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 12246-12251
- Martin, W., Russel, M.J. (2003) On the origins of cells: a hypothesis for the evolutionary transitions from abiotic geochemistry to chemoautotrophic prokaryotes, and from prokaryotes to nucleated cells. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **358** (1429): 59-85
- Martin, W., Stoebe, B., Goremykin, V., Hans-Mann, S., Hasegawa, M., Kowallik, K.V. (1998) Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts. *Nature* **393**: 162-165
- McFadden, G.I. (2001) Primary and secondary endosymbiosis and the origin of plastids. *J. Phycol.* **37**: 951-959
- Matsuzaki, M., Misumi, O., Shin-I, T., Maruyama, S., Takahara, M., Miyagishima, S.Y., Mori, T., Nishida, K., Yagisawa, F., Nishida, K., Yoshida, Y., Nishimura, Y., Nakao, S., Kobayashi, T., Momoyama, Y., Higashiyama, T., Minoda, A., Sano, M., Nomoto, H., Oishi, K., Hayashi, H.,

- Ohta, F., Nishizaka, S., Haga, S., Miura, S., Morishita, T., Kabeya, Y., Terasawa, K., Suzuki, Y., Ishii, Y., Asakawa, S., Takano, H., Ohta, N., Kuroiwa, H., Tanaka, K., Shimizu, N., Sugano, S., Sato, N., Nozaki, H., Ogasawara, N., Kohara, Y., Kuroiwa, T. (2004) Genome sequence of the ultrasmall unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Nature* **428**: 653-657
- McQueen-Mason, S. & Cosgrove, D.J. (1995) Expansin mode of action on cell walls: analysis of wall hydrolysis, stress relaxation, and binding. *Plant Physiol.* **107**: 87–100
- Meinke, D.W., Sussex, I.M. (1979) Embryo-lethal mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Devel. Biol.* **72**: 50-61
- Mereschkowsky, C. (1905) Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. *Biol. Zentralblatt* **25**: 593-604
- Mihara, H., Kurihara, T., Yoshimura, T. and Esaki, N. (1999). A *nifS*-like gene, *csdB*, encodes an *Escherichia coli* counterpart of mammalian selenocysteine lyase. Gene cloning, purification, characterization and preliminary x-ray crystallographic studies. *J. Biochem.* **127**: 559-567
- Mochizuki, N., Brusslan, J., Larkin, J., Nagatani, A., Chory, J. (2001) *Arabidopsis* genomes uncoupled 5 (*GUN5*) mutant reveals the involvement of Mg chelatase H subunit in plastid-to-nucleus signal transduction. *Proc.Natl. Acad. Sci USA* **98**: 2053-2058
- Møller, S.G., Kunkel, T. and Chua, N-H. (2001). A plastidic ABC protein involved in intercompartmental communication of light signaling. *Genes & Dev.* **15**: 90-103
- Monte, E., Tepperman, J.M., Al-Sady, B., Kaczorowski, K.A., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Li, X., Zhang, Y., Quail, P.H. (2004) The phytochrome-interacting transcription factor, PIF3, acts early, selectively, and positively in light-induced chloroplast development. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **101** (46): 16091-16098
- Montgomery, B.L., Lagarias, J.C. (2002) Phytochrome ancestry: sensors of bilins and light. *Trends Plant Sci.* **7** (8): 357-366
- Mullet, J.E. (1998) Chloroplast development and gene expression. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **39**: 475-502

- Nachin, L., El Hassouni, M., Loiseau, L., Expert, D. and Barras, F. (2001). SoxR-dependent response to oxidative stress and virulence of *Erwinia chrysanthemi*: the key role of SufC, an orphan ABC ATPase. *Mol. Microbiol.* **39** (4): 960-972
- Nachin, L., Loiseau, L., Expert, D. and Barras, F. (2003). SufC : an unorthodox cytoplasmic ABC/ATPase required for [Fe-S] biogenesis under oxidative stress. *EMBO J.* **22** (3): 427-437
- Neff, M.M., Fankhauser, C., Chory, J. (2000) Light: An indicator of time and place. *Genes Dev.* **14**: 257-271
- Nicholas, K.B., Nicholas, H.B.jr., Deerfield, D.W.II. (1997) GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation. *EMBNEW.NEWS* **4**: 14
- Niyogi, K.K. (1999) Photoprotection revisited. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**: 333-359
- Oh, E., Kim, J., Park, E., Kim, J.I., Kang, C., Choi, G. (2004) PIL5, a phytochrome-interacting basic helix-loop-helix protein, is a key negative regulator of seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **16** (11): 3045-3058
- Ohta, N., Matsuzaki, M., Misumi, O., Miyagishima, S.Y., Nozaki, H., Tanaka, K., Shin-I, T., Kohara, Y., Kuroiwa, T. (2003) Complete sequence and analysis of the plastid genome of the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *DNA Res.* **10** (2): 67-77
- Ollagnier-de-Choudens, S., Sanakis, Y., Fontecave, M. (2004) SufA/IscA: reactivity studies of a class of scaffold proteins involved in [Fe-S] cluster assembly. *J. Biol. Inorg. Chem.* **9** (7): 828-838
- Outten, F.W., Djaman, O., Storz, G. (2004) A *suf* operon requirement for Fe-S cluster assembly during iron starvation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **52**: 861-872
- Outten, F.W., Wood, M.J., Muñoz, F.M. and Storz, G. (2003). The SufE protein and the SufBCD complex enhance SufS cysteine desulfurase activity as a part of a sulfur transfer pathway for Fe-S cluster assembly in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **278** (46): 45713-45719

- Palmer, J.D. (1997) Organelle genomes: going, going, gone! *Science* **275**: 790-791
- Palmer, J.D., Delwiche, C.F. (1996) Second-hand chloroplasts and the case of the disappearing nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 7432-7435
- Patzer, S.I. and Hantke, K. (1999). SufS is a NifS-like protein, and SufD is necessary for Stability of the [2Fe-2S] FhuF protein in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181** (10): 3307-3309
- Perry, S.E., Buvinger, W.E., Bennett, J, Keegstra, K. (1991) Synthetic analogues of a transit peptide inhibit binding or translocation of chloroplastic precursor proteins. *J. Biol. Chem.* **266** (18): 11882-11889
- Petit, J.M., Van Wuytswinkel, O., Briat, J.F., Lobréaux, S. (2001) Characterization of an iron-dependent regulatory sequence involved in the transcriptional control of AtFer1 and ZmFer1 plant ferritin genes by iron. *J. Biol. Chem.* **276**: 5584-5590
- Pfannschmidt, T., Nilsson, A., Allen, J.F. (1999) Photosynthetic control of chloroplast gene expression. *Nature* **397**: 625-628
- Pfannschmidt, T., Allen, J.F., Oelmüller, R. (2001) Principles of redox control of photosynthesis gene expression. *Physiol. Plant.* **112**: 1-9
- Pilon-Smits, E. A., Garifullina, G. F., Abdel-Ghany, S., Kato, S., Mihara, H., Hale, K. L., Burkhead, J. L., Esaki, N., Kurihara, T., Pilon, M. (2002) Characterization of a NifS-like chloroplast protein from *Arabidopsis*. Implications for its role in sulfur and selenium metabolism. *Plant Physiol.* **130**: 1309-1318
- Prussak, C.E., Almazan, M.T., Tseng, B.Y. (1989) Peptide production from proteins separated by sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **178** (2): 233-238
- Quail, P.H. (2002) Phytochrome photosensory signalling networks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**: 85-93
- Quail, P.H., Boylan, M.T., Parks, B.M., Short, T.W., Xu, Y., Wagner, D. (1995) Phytochromes: Photosensory perception and signal transduction. *Science* **268**: 675-680

- Race, H.L., Herrmann, R.G., Martin, W. (1999) Why have organelles retained genomes? *Trends Genet.* **15**: 364-370
- Ralph, S.A., Foth, B.J., Hall, N., McFadden, G.I. (2004) Evolutionary pressures on apicoplast transit peptides. *Mol. Biol. Evol.* **21** (12): 2183-2194
- Rangachari, K., Davis, C.T., Eccleston, J.F., Hirst, E.M.A., Saldanha, J.W., Strath, M. and Wilson, R.J.M. (Iain) (2002). SufC hydrolyzes ATP and interacts with SufB from *Thermotoga maritima*. *FEBS Lett.* **514**: 225-228
- Rashotte, A.M., Carson, S.D., To, J.P., Kieber, J.J. (2003) Expression profiling of cytokinin action in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **132**: 1998–2011
- Reinbothe, S., Reinbothe, C. (1996) Regulation of chlorophyll biogenesis in angiosperm. *Plant Physiol.* **111**: 1-7
- Repine, J.E., Fox, R.B., Berger, E. (1981) Hydrogene peroxide kills *Staphylococcus aureus* by reacting with staphylococcal iron to form hydroxil radicals. *J. Biol. Chem.* **256**: 7094-7096
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M., Stanier, R.Y. (1979) Genetic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* **111**: 1-61
- Sakai, H., Aoyama, T., Oka, A. (2000) *Arabidopsis* ARR1 and ARR2 response regulators operate as transcriptional activators. *Plant J.* **24**: 703–711
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1998) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Schindler, C., Soll, J. (1986) Protein transport in intact, purified pea etioplasts. *Arch. Biochem. Biophys.* **247** (1): 211-220
- Schneider, E., Hunke, S. (1998) ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: Functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiol. Rev.* **22**: 1-20

- Seyedi, M., Selstam, E., Timko, M.P., Sundqvist, C. (2001) The cytokinin 2-isopentenyladenine causes partial reversion to skotomorphogenesis and induces formation of prolamellar bodies and protochlorophyllide657 in the *lip1* mutant of pea. *Physiological Plant* **112**: 261-272
- Singer, G.A., Hickey, D.A. (2000) Nucleotide bias causes a genomewide bias in the amino acid composition of proteins. *Mol. Biol. Evol.* **17**: 1581-1588
- Sohal, A.K., Pallas, J.A., Jenkins, G.I. (1999) The promoter of a *Brassica napus* lipid transfer protein gene is active in a range of tissues and stimulated by light and viral infection in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* **41**: 75-87
- Steinmann, T., Geldner, N., Grebe, M., Mangold, S., Jackson, C.L., Paris, S., Gälweiler, L., Palme, K., Jürgens, G. (1999) Coordinated polar localisation of auxin efflux carrier PIN1 by GNOM ARF GEF. *Science* **286**: 316-318
- Stoebe, B., Martin, W., Kowallik, K.V. (1998) Distribution and nomenclature of protein-coding genes in 12 sequenced chloroplast genomes. *Plant. Mol. Biol. Rep.* **16**: 243-255
- Stoebe, B., Kowallik, K.V. (1999) Gene-cluster analysis in chloroplast genomics. *Trends Genet.* **15**: 344-347
- Strand, A., Asami, T., Alonso, J., Ecker, J.R., Chory, J. (2003) Chloroplast to nucleus communication triggered by accumulation of Mg-protoporphyrin IX. *Nature* **421**: 79-83
- Sugiura, M., Hirose, T., Sugita, M. (1998) Evolution and mechanism of translation in chloroplasts. *Annu. Rev. Genet.* **32**: 437-459
- Sullivan, J.A., Gray, J.C. (1999) Plastid translation is required for the expression of nuclear photosynthesis genes in the dark and in roots of the pea *lip1* mutant. *Plant Cell* **11**: 901-911
- Sweere, U., Eichenberg, K., Lohrmann, J., Mira-Rodado, V., Baurle, I., Kudla, J., Nagy, F., Schafer, E., Harter, K. (2001) Interaction of the response regulator ARR4 with phytochrome B in modulating red light signaling. *Science* **294**, 1108–1111

- Takagi, H., Shi, D., Ha, Y., Allewell, N.M., Theil, E.C. (1998) Localized unfolding at the junction of three ferritin subunits. A mechanism for iron release? *J. Biol. Chem.* **273**: 18685-18688
- Takahashi, Y. and Nakamura, M. (1999). Functional assignment of the ORF2-iscS-iscU-iscA-hscB-hscA-fdx-ORF3 gene cluster involved in the assembly of Fe-S clusters in *Escherichia coli*. *J. Biochem. (Tokyo)* **126** (5): 917-926
- Takahashi, Y., Tokumoto, U. (2002). A third bacterial system for the assembly of iron-sulfur clusters with homologs in archaea and plastids. *J. Biol. Chem.* **277** (32): 28380-28383
- Taylor, B.L., Zhulin, I.B. (1999) PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63** (2):479-506
- Tepperman, J.M., Zhu, T., Chang, H.S., Wang, X., Quail, P.H. (2001) Multiple transcription-factor genes are early targets of phytochrome A signalling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 9437-9442
- The *Arabidopsis* Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796-815
- Thimm, O., Blaesing, O., Gibon, Y., Nagel, A., Meyer, S., Krüger, P., Selbig, J., Müller, L.A., Rhee, S.Y., Stitt, M. (2004) MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant J.* **37** (6): 914-939
- Tinland, B. (1996) The integration of T-DNA into plant genomes. *Trends in Plant Science* **1**: 178-184
- To., J.P.C., Haberer, G., Ferreira, F.J., Deruère, J., Mason, M.G., Schaller, G.E., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Kieber, J.J. (2004) Type-A *Arabidopsis* response regulators are partially redundant negative regulators of cytokinin signaling. *Plant Cell* **16**: 658-671

- Tolmasky, M.E., Wertheimer, A.M., Actis, L.A., Crosa, J.H. (1994) Characterization of the *Vibrio anguillarum fur* gene: role in regulation of expression of the FatA outer membrane protein and catechols. *J. Bacteriol.* **176**: 213-220
- Towbin, H., Steahlin, T., Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4530-4554
- Tsugeki, R., Kochieva, E.Z., Fedoroff, N. (1996) A transposon insertion in the *Arabidopsis* SSR16 gene causes an embryo-defective lethal mutation. *Plant. J.* **10**: 479-489
- Uwer, U., Willmitzer, L., Altmann, T. (1998) Inactivation of a glycyl-tRNA synthetase leads to an arrest in plant embryo development. *Plant Cell* **10**: 1277-1294
- Verra, F., Hughes, A.L. (1999) Biased amino acid composition in repeat regions of *Plasmodium* antigens. *Mol. Biol. Evol.* **16**: 627-633
- von Arnim, A., Deng, X.W. (1996) Light control of seedling development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**: 215-243
- von Arnim, A.G., Deng, X.-W. and Stacey, M.G. (1998). Cloning vectors for the expression of green fluorescent protein fusion proteins in transgenic plants. *Gene* **221**: 35-43
- Vothknecht, U.C., Westhoff, P. (2001) Biogenesis and origin of thylakoid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1541**: 91–101
- Waller, R.F., Reed, M.B., Cowman, A.F., McFadden, G.I. (2000) Protein trafficking to the plastid of *Plasmodium falciparum* is via the secretory pathway. *EMBO J.* **19**: 1794-1802
- Wang T., Shen G., Balasubramanian R., McIntosh L., Bryant D.A., Golbeck J.H. (2004) The *sufR* gene (*sll0088* in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803) functions as a repressor of the *sufBCDS* operon in iron-sulfur cluster biogenesis in cyanobacteria. *J Bacteriol.* **186** (4): 956-967

- Wang, H., Ma, L., Habashi, J., Li, J., Zhao, H., Deng, X.W. (2002) Analysis of far-red light-regulated genome expression profiles of phytochrome A pathway mutants in *Arabidopsis*. *Plant J.* **32**: 723-733
- Wastl, J., Maier, U.G. (2000) Transport of proteins into cryptomonads complex plastids. *J. Biol. Chem.* **275**: 23194-23198
- Whitney, S.E.C., Gidley, M.J. & McQueen-Mason, S. (2000) Probing expansin action using cellulose/hemicellulose composites. *Plant J.* **22**: 327-334
- Williams, J.G.K. (1986) *Meth. Enzym.* **167**: 766-778.
- Wilson, R.J.M. et al. (1996) Complete gene map of the plastid-like DNA of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J. Mol. Biol.* **261**: 155-172
- Wimley, W.C. (2003) The versatile β -barrel membrane proteine. *Current Opinions in Structural Biology* **13**: 404-411
- Woodmansee, A.N., Imlay, J.A. (2002) Quantitation of intracellular free iron by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Methods Enzymol.* **349**: 3-9
- Xiong, A., Singh, V.K. Cabrera, G., Jayaswal, R.K. (2000) Molecular characterization of the ferric-uptake regulator, *fur*, from *Staphylococcus aureus*. *Microbiol.* **146**: 659-668
- Xu, M.X. and Møller, S.G. (2004). AtNAP7 is a plastidic SufC-like ATP-binding cassette/ATPase essential for *Arabidopsis* embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101** (24): 9143-9148
- Ye, H., Garifullina, G.F., Abdel-Ghany, S.E., Zhang, L., Pilon-Smits, E.A., Pilon, M. (2005) The chloroplast NifS-like protein of *Arabidopsis thaliana* is required for iron-sulfur cluster formation in ferredoxin. *Planta* **220**: 602-608
- Yu, B., Wakao, S., Fan, J., Benning, C. (2004) Loss of plastidic lysophosphatidic acid acyltransferase causes embryo-lethality in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* **45** (5): 503-510

Yu, J., Shen, G., Wang, T., Bryant, D.A., Golbeck, J.H., McIntosh, L. (2003) Suppressor mutations in the study of Photosystem I biogenesis: *slr0088* is a previously unidentified gene involved in reaction center accumulation in *Synechocystis* sp. Strain PCC6803. *J. Bacteriol.* **185**: 3878-3887

Zauner, S., Fraunholz, M., Wastl, J., Penny, S., Beaton, M., Cavalier-Smith, T., Maier, U.G., Douglas, S. (2000) Chloroplast protein and centrosomal genes, a tRNA intron, and odd telomeres in an unusually compact eukaryotic genome, the cryptomonad nucleomorph. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 200-205

Zheng, L., Cash, V.L., Flint, D.H. and Dean, D.R. (1998). Assembly of iron-sulfur clusters. Identification of an *iscSUA-hscBA-fdx* gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *J. Biol. Chem.* **273**: 13264–13272

Zheng, L., Dean, D.R. (1994) Catalytic formation of a nitrogenase iron-sulfur cluster. *J. Biol. Chem.* **269**: 18723-18726

Zheng, L., White, R.H., Cash, V.L., Jack, R.F. and Dean, D.R. (1993). Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 2754-2758

Dank

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern des Fachbereichs Biologie, die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben.

Besonders danke ich Professor Dr. Uwe Maier für die vielfältige Unterstützung meiner Arbeit und die häufige Diskussionsbereitschaft.

Bei Dr. Stefan Zauner bedanke ich mich für die zahlreichen Sequenzierungen und seine Hilfsbereitschaft in Fragen der alltäglichen Laborpraxis, sowie besonders für das gründliche und gewissenhafte Korrekturlesen der Arbeit.

Für ihre Kompetenz bei mikroskopischen und messtechnischen Fragen danke ich Dr. Erhard Mörschel und Dr. Klaus Wenderoth.

Marianne Johannsen und Christa Zimmermann danke ich für die Unterstützung bei der Elektronenmikroskopie und für die Betreuung der Algenkulturen.

Bei Dr. Franz Grolig bedanke ich mich für die Einführung in die KLSM-Mikroskopie.

Markus Müller und Agnes Debelius möchte ich für die Einarbeitung in die Techniken zur Transformation von Protoplasten und die Bereitstellung der Zellkulturen danken.

Ganz besonders möchte ich Dr. Katalin Hadfi für die große Unterstützung bei allen Fragen zu *Arabidopsis thaliana* und die gute Zusammenarbeit herzlich danken.

Allen Doktoranden, Diplomanden und Hiwis der Arbeitsgruppe Maier, besonders Maik, Oliver, Sven und Christoph danke ich für die produktive Zusammenarbeit und die entspannte und angenehme Laboratmosphäre während meiner gesamten Doktorarbeit.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation „**SufD – Bestandteil eines essentiellen plastidär lokalisierten Systems in Cyanobakterien, Cryptomonaden und höheren Pflanzen**„ selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 14.11.2005